

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**NOVO GENE *cry8* DE *Bacillus thuringiensis*:
CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE
AO BICUDO DA CANA-DE-AÇÚCAR, *Sphenophorus levis*
VAURIE, 1978 (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)**

Juliana Regina Rossi

Bióloga

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Julho de 2011

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**NOVO GENE *cry8* DE *Bacillus thuringiensis*:
CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE
AO BICUDO DA CANA-DE-AÇÚCAR, *Sphenophorus levis*
VAURIE, 1978 (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)**

Juliana Regina Rossi

Orientador: Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos

Co-orientadora: Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Julho de 2011

Ross, Juliana Regina
R832n Novo gene *cry8* de *Bacillus thuringiensis*: caracterização e avaliação da patogenicidade ao bicudo da cana-de-açúcar, *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae) / Juliana Regina Rossi. – – Jaboticabal, 2011
xi, 93 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011

Orientador: Manoel Victor Franco Lemos

Co-orientadora: Janete Aparecida Desidério

Banca examinadora: Ana Maria Guidelli Thuler, Fernando Hercos Valicente, Lucia Maria Carareto Alves, Odair Aparecido Fernandes

Bibliografia

1. *Bacillus thuringiensis*. 2. Primer walking. 3. Sequenciamento 4. Ensaio de patogenicidade. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 632.937:633.61

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

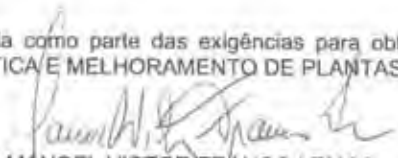
TÍTULO: NOVO GENE *cry8* DE *Bacillus thuringiensis*: CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE AO BICUDO DA CANA-DE-AÇÚCAR, *Sphenophorus levis* VAURIE, 1978 (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)

AUTORA: JULIANA REGINA ROSSI

ORIENTADOR: Prof. Dr. MANOEL VICTOR FRANCO LEMOS

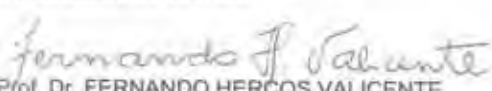
CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. JANETE APPARECIDA DESIDERIO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM AGRONOMIA (GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. MANOEL VICTOR FRANCO LEMOS

Departamento de Biologia Aplicada A Agropecuária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

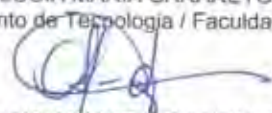

Profa. Dra. ANA MARIA GUIDELLI THULER
Universidade de Uberaba


Prof. Dr. FERNANDO HERCOS VALICENTE

Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo / Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária / Sete Lagoas/MG


Profa. Dra. LUCIA MARIA CARARETO ALVES

Departamento de Tecnologia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Prof. Dr. ODAIR APARECIDO FERNANDES

Departamento de Fitossanidade / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Data da realização: 12 de julho de 2011.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

JULIANA REGINA ROSSI – nascida em 09 de dezembro de 1980, na cidade de Jaboticabal - SP, é Bióloga, graduada no curso de Ciências Biológicas (Licenciatura Plena e Bacharelado com ênfase em Ciências Ambientais) pelo Centro Universitário de Araraquara (UNIARA), Araraquara - SP, em março/2004. Foi bolsista de Treinamento Técnico - I da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP), Departamento de Tecnologia, Campus de Jaboticabal - SP, na qual contribuiu para a Implantação do Centro Brasileiro de Estocagem de Clones (BCCCenter), no período de 10/2000 a 11/2002. Desenvolveu o projeto “Morfologia e histologia da porção inicial do sistema digestório da perdiz *Rhynchotus rufescens*” como bolsista de Iniciação Científica FAPESP pela instituição FCAV/UNESP, no Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, em 2003. Em 2004, realizou estágio junto ao Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA), do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, FCAV/UNESP. Em março/2005, ingressou no curso de mestrado em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) pela FCAV/UNESP, desenvolvendo sua pesquisa como bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Obteve o título de mestre em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) em 13 de julho de 2007, sendo sua dissertação intitulada: “*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* SPS1: caracterização da região promotora e efeito em larvas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae)”. Em agosto/2007, ingressou no Curso de Doutorado na mesma área e instituição em que realizou o Mestrado, sendo bolsista da CAPES. Constituiu o grupo de pesquisa responsável pelo desenvolvimento do Projeto Temático “Pest management using *Bacillus thuringiensis* cry genes”, financiado pela FAPESP. Participou da comissão organizadora do “Curso de Inverno de Genética” (FCAV/UNESP), nas edições de 2005 à 2011, sendo que nos anos de 2010 e 2011 foi coordenadora do evento.

“Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Não importa quais sejam os obstáculos e as dificuldades. Se estamos possuídos de uma inabalável determinação, conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho.”

Dalai Lama

Aos meus pais **Arlindo Rossi** e **Sônia Aparecida Agostinho Rossi**,
pelo amor incondicional, exemplo de vida, incentivo, pela dedicação e torcida.

Ao meu irmão **André Luís Rossi**,
pelo carinho, exemplo de determinação, apoio e pela amizade.

... eu só tenho a agradecer a Deus por me presentear com pessoas tão
maravilhosas ... **AMO VOCÊS FAMÍLIA!!!**

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus e à Nossa Senhora Aparecida pela presença constante em minha vida, possibilitando a realização de mais um sonho.

Aos meus pais, Arlindo e Sônia, e a meu irmão André, por serem anjos em minha vida, exemplos de dedicação, perseverança e caráter.

À toda minha família, em especial ao meu avô Joaquim Agostinho, aos tios Sidney, Dalva, Sueli, Isaltina e Rubens e, aos primos Sidney Junior, Silvio, Sintya, Sarah, Débora, Leandro, Carmem e Wilton, pela torcida, pelo incentivo, carinho e pelos momentos de união e alegria vivenciados.

Ao Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos, pelo profissionalismo, pelos ensinamentos que muito contribuíram para meu crescimento científico, intelectual e pessoal, pela amizade, competência, confiança em mim depositada e orientação imprescindível para a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério, pela co-orientação, amizade e pelos conhecimentos transmitidos no decorrer deste trabalho.

À Dra. Viviane Schuch, pelo profissionalismo, auxílio imprescindível no isolamento do novo gene *cry* de *Bacillus thuringiensis* e pela amizade.

Ao Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), em especial aos pesquisadores Dra. Sabrina Moutinho Chabregas, Dr. Enrico de Beni Arrigoni e Luis Carlos de Almeida, e a técnica Sueli Aparecida Piacentini, pelo profissionalismo, auxílio e fornecimento das larvas de *Sphenophorus levis* para a realização do bioensaio.

Aos amigos Ana Maria Guidelli Thuler, Claudio Damasceno Pavani, Meire de Cássia Alves e Najara da Silva, pela amizade, disponibilidade e pelo auxílio na elaboração dos bioensaios.

Ao Dr. Luciano Takeshi Kishi, pelos ensinamentos concedidos durante a confecção da árvore filogenética e pela amizade.

À Eliane Cristina da Cunha Alves, pela amizade e pelo suporte técnico durante a condução dos experimentos.

À Profa. Dra. Maria Inês Tiraboschi Ferro, à Profa. Dra. Eliana Gertrudes Macedo Lemos, ao Prof. Sérgio Antonio de Bortoli e ao Prof. Dr. Hélio José Montassier, por permitirem a utilização de equipamentos e da infra-estrutura de seus laboratórios durante a execução dos experimentos, pelo profissionalismo e pela amizade.

Aos membros do Exame Geral de Qualificação, Profa. Dra. Luciana Rossini Pinto, Prof. Dr. Jackson Antônio Marcondes de Souza, Profa. Dra. Katia Cristina Kupper e Profa. Dra. Ana Maria Guidelli Thuler, pela participação e sugestões científicas que muito contribuíram para esta tese.

Aos membros da Comissão Examinadora, Profa. Dra. Ana Maria Guidelli Thuler, Prof. Dr. Fernando Hercos Valicente, Profa. Dra. Lúcia Maria Carareto Alves e Prof. Dr. Odair Aparecido Fernandes, pela disponibilidade, pelas valiosas sugestões e pelo esmero na correção deste trabalho.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCAV/UNESP), ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) e aos docentes desta instituição, pelas disciplinas ministradas, pelo ensino de qualidade, conhecimento intelectual adquirido e pela oportunidade de realizar o curso de doutorado.

Ao Prof. Dr. Rinaldo César de Paula, coordenador do curso de Pós-Graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), pela disponibilidade, amizade e pelo auxílio sempre que precisei.

Ao Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária (FCAV/UNESP), pela concessão do espaço físico e infra-estrutura de suas dependências para realização desta pesquisa.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, em especial à Maria Lucina de Oliveira Moraes da Silva, Aldo Antônio de Souza e Ivana Aparecida Martucci Garcia, pela amizade e pelos momentos de convívio.

Aos queridos amigos Daniela Oliveira, Poliana Altafim, Geiza Carla, Maria das Graças, Rafaela, Ana Mikki Nakamura, Juliana Nakamura, Poliana Melo, Letícia Carregari, Matheus Vilhena Parenti, Alessandra Niero Máximo, Tiago Máximo, pela valiosa amizade, torcida, pelas orações, pelo carinho e incentivo.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA), Ana Maria, Ana Rita, André, Bruna, Camila Davolos, Camila Figueiredo, Caroline, Claudio, Deise, Elaine, Eliane, Fernanda, Irlan, Janaína, Jaqueline, Juliana Costa, Juliana Leite, Juliana Xavier, Larissa, Laura, Lúcia, Maria Gabriela, Marta, Meire, Michele, Naiara, Najara, Paula, Rebeca, Roberta, Selma (in memoriam), Suzana, Vivian, Viviana Tibaduiza, Viviane Matos e Viviane Vianna, pela amizade, pelo conhecimento compartilhado e pelos momentos que convivemos juntos, os quais serão levados pra sempre em meu coração e em minha memória.

Aos docentes, amigos e colegas do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP), Profa. Dra. Eliana Gertrudes Macedo Lemos, Profa. Dra. Lucia Maria Carareto Alves, Andressa, Eliamar, Elisangela, Gabriela, Gisele, Haroldo, Helena, Hemelin Ludmila, Jackson, João Carlos, Karla, Maira, María Teresa, Milena, Renato, Rosmeriana, Silvana, Tehuni, Tereza, Viviane Schuch e Viviane Vieira, pela amizade, pelo auxílio e pelos conhecimentos a mim concedidos.

Aos docentes, amigos e colegas do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBBM), Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro, Profa. Dra. Maria Inês Tiraboschi Ferro, Agda, Ana Carolina, Andréia, Daniele, Elaine, Fabrício, Flávia Dall'Aqua, Flávia Carvalho, Gisele, Juliana, Júlio, Karina, Marilza, Mônica, Rafael, Renata, pela amizade, pelos ensinamentos e bons momentos que passamos juntos.

Ao Prof. Dr. Sérgio Antonio de Bortoli e aos colegas do Laboratório de Biologia e Criação de Insetos (LBCI), Cácia, Marina, João Rafael, Iara, Elizabeth, Robson, Roberto, Alessandra, Alessandra Marieli, Gustavo, Ana Carolina, Valéria, Haroldo, pela recepção no laboratório durante a execução do bioensaio e pela amizade.

À todos os amigos e colegas de Pós-Graduação, pela amizade, troca de experiências, pelos ensinamentos e bons momentos compartilhados.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação e da Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, pela disponibilidade na prestação de serviços.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de doutorado, essencial para a realização deste trabalho.

À todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização desta pesquisa, MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS!!!

SUMÁRIO

Página

LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO	x
SUMMARY	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. A cultura da cana-de-açúcar (<i>Saccharum</i> spp.)	4
2.2. <i>Sphenophorus levis</i> Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae)	7
2.3. <i>Bacillus thuringiensis</i>	10
2.3.1. δ -endotoxinas	11
2.3.2. Estrutura tridimensional das proteínas Cry	13
2.3.3. Mecanismo de ação da proteína cristal	14
2.4. Transformação genética de plantas	16
3. OBJETIVOS	19
3.1. Objetivo geral	19
3.2. Objetivos específicos	19
4. MATERIAL & MÉTODOS	20
4.1. Linhagens e isolados de <i>Bacillus thuringiensis</i>	20
4.2. Condições de cultivo das células bacterianas	21
4.3. Extração e quantificação do DNA genômico de <i>B. thuringiensis</i>	21
4.4. Detecção de genes <i>cry8</i> (coleóptero-específicos) por PCR	23
4.5. Clonagem do fragmento gênico em vetor pGEM [®] -T Easy	25
4.6. Transformação de células de <i>Escherichia coli</i> com DNA plasmidial	26

4.7. Minipreparação de DNA plasmidial.....	27
4.8. Análise dos clones por PCR e restrição enzimática	28
4.8.1. Confirmação dos clones recombinantes pela técnica de PCR	28
4.8.2. Confirmação dos clones recombinantes por restrição.....	29
4.9. Sequenciamento e análise dos clones positivos para o gene <i>cry8</i>	30
4.10. Determinação da sequência completa do gene <i>cry8</i> pela estratégia de “primer walking”	32
4.11. Toxicidade de proteínas Cry solubilizadas para larvas de <i>Sphenophorus</i> <i>levis</i>	37
4.11.1. Obtenção das proteínas Cry de <i>B. thuringiensis</i>	37
4.11.2. Ensaio de patogenicidade com larvas de <i>S. levis</i>	39
5. RESULTADOS & DISCUSSÃO	41
5.1. Análise do conteúdo de genes <i>cry8</i> em isolados de <i>B. thuringiensis</i>	41
5.2. Obtenção da sequência completa do gene <i>cry8</i> presente no isolado de <i>B.</i> <i>thuringiensis</i> BT_I622	45
5.2. Patogenicidade da nova proteína Cry8 de BT_I622 à larvas de 2 ^o instar de <i>S. levis</i>	77
6. CONCLUSÕES.....	79
7. REFERÊNCIAS	80

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Principais regiões produtoras da cana-de-açúcar no Brasil e localização das usinas (em vermelho). Fonte: < http://www.unica.com.br/content/ >. 16 julho 2011.....	6
Figura 2. Ciclo biológico do bicudo da cana-de-açúcar <i>Sphenophorus levis</i> Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae). Disponível em: < http://galeria.cuiket.com.br/foto/ciclo-do-bicudo-da-cana-sphenophorus-levis_5225.html >. 16 julho 2011	8
Figura 3. Danos gerados pelas larvas de <i>S. levis</i> nos colmos e rizomas da cana-de-açúcar. Disponível em: < http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=39# >. 16 julho 2011.....	9
Figura 4. Estrutura primária das δ -endotoxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i> : localização dos domínios e blocos conservados (de MAAGD et al., 2001)	12
Figura 5. Estrutura tridimensional da proteína Cry8Ea1 evidenciando (A) domínios I (em azul), II (em verde) e III (em vermelho). (B) Blocos conservados: 1 (azul), 2 (amarelo), 3 (laranja), 4 e 5 (violeta) e a porção restante em cinza.....	13
Figura 6. Modo de ação das proteínas Cry de <i>Bacillus thuringiensis</i> . Fonte: < http://web.utk.edu/~jurar/Btresearchtable.html >. 16 julho 2011	15
Figura 7. Mapa do vetor de clonagem pGEM®-T Easy (Promega®)	25
Figura 8. Bioensaio com larvas de 2º ínstar de <i>Sphenophorus levis</i> (Coleoptera: Curculionidae) submetidas aos tratamentos com proteínas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	40

- Figura 9.** Esquema ilustrando a utilização dos iniciadores gerais (Bravo et al., 1998) para a detecção do gene *cry8* em 46 isolados de *B. thuringiensis*41
- Figura 10.** Eletroforograma evidenciando o produto de amplificação obtido por PCR com a utilização de oligonucleotídeos iniciadores gerais para o gene *cry8*. Canaleta 1: BT_I622; 2: *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*; 3: *B. thuringiensis* var. *israelensis*; CN: controle negativo da reação. MM - marcador molecular “GeneRuler™ 1 kb DNA ladder” (Fermentas Life Sciences)42
- Figura 11.** Análise dos clones recombinantes pelas técnicas de PCR (A) e pela restrição enzimática (B). Canaleta 1-15: clones obtidos a partir do isolado BT_I622 com os oligonucleotídeos gerais (Gral-cry8[d] e Gral-cry8[r]). MM - marcador molecular “GeneRuler™ 1kb DNA ladder” (Fermentas Life Sciences)44
- Figura 12.** Resultado da análise de similaridade do fragmento do gene *cry8* (~376 pb) por meio da ferramenta Blastn utilizando o banco de dados GenBank.45
- Figura 13.** Esquema ilustrando a utilização dos iniciadores Gral-cry8 (d) (Bravo et al., 1998) e Gral-cry3 (r) (Ben-Dov et al., 1997) na estratégia de “primer walking” 46
- Figura 14.** Eletroforograma evidenciando o produto de amplificação obtido por PCR com a utilização dos oligonucleotídeos iniciadores Gral-cry8 (d) (Bravo et al., 1998) e Gral-cry3 (r) (Ben-Dov et al., 1997). Canaleta 1: BT_I622; 2: *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*; 3: *B. thuringiensis* var. *israelensis*; CN: controle negativo da reação. MM - marcador molecular “GeneRuler™ 1kb DNA ladder” (Fermentas Life Sciences)46
- Figura 15.** Análise dos clones recombinantes pelas técnicas de PCR (A) e pela restrição enzimática (B). Canaletas 1-10: clones resultantes do processo de transformação com o fragmento gênico de 1420 pb. MM - marcador molecular “GeneRuler™ 1kb DNA ladder” (Fermentas Life Sciences)47

- Figura 16.** Resultado da análise de similaridade do fragmento do gene *cry8* (1420 pb) por meio da ferramenta Blastn utilizando o banco de dados GenBank48
- Figura 17.** Esquema ilustrando a utilização dos iniciadores Gral-cry8 (d) (Bravo et al., 1998) e Cry8-C3 (r) na estratégia de “primer walking”50
- Figura 18.** Eletroforograma evidenciando o produto de amplificação obtido por PCR com a utilização dos iniciadores Gral-cry8 (d) (BRAVO et al., 1998) e Cry8-C3 (r). Canaleta 1: BT_I622; 2: *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*; 3: *B. thuringiensis* var. *israelensis*; CN: controle negativo da reação. MM - marcador molecular “GeneRuler™ 1kb DNA ladder” (Fermentas Life Sciences).....50
- Figura 19.** Análise dos clones recombinantes pelas técnicas de PCR (A) e pela restrição enzimática (B). Canaletas 1-16: clones resultantes do processo de transformação com o fragmento gênico de 3302 pb. MM - marcador molecular “GeneRuler™ 1kb DNA ladder” (Fermentas Life Sciences).....51
- Figura 20.** Resultado da análise de similaridade do fragmento do gene *cry8* (3302 pb) por meio da ferramenta Blastn utilizando o banco de dados GenBank52
- Figura 21.** Esquema ilustrando a utilização dos iniciadores Cry8-C4 (d) e Cry8-C4 (r) na estratégia de “primer walking”54
- Figura 22.** Esquema ilustrando a utilização dos iniciadores Cry8-C5 (d) e Cry8-C5 (r) na estratégia de “primer walking”54
- Figura 23.** Esquema ilustrando a utilização dos iniciadores Cry8-C6 (d) e Cry8-C6 (r) na estratégia de “primer walking”55

Figura 24. Eletroforograma evidenciando os produtos de amplificação obtidos a partir do isolado BT_I622 com diferentes oligonucleotídeos iniciadores. Canaleta 1: Cry8-C4 (d / r); 2: Cry8-C5 (d / r); 3: Cry8-C6 (d / r); CN: controle negativo da reação. MM - marcador molecular “GeneRuler™ 1kb DNA ladder” (Fermentas Life Sciences)55

Figura 25. Análise dos clones recombinantes pelas técnicas de PCR (A) e pela restrição enzimática (B). Canaleta 1-10: clones resultantes do processo de transformação com o fragmento gênico de 628 pb. MM - marcador molecular “GeneRuler™ 1kb DNA ladder” (Fermentas Life Sciences).....56

Figura 26. Análise dos clones recombinantes pelas técnicas de PCR (A) e pela restrição enzimática (B). Canaletas 1-6: clones resultantes do processo de transformação com o fragmento gênico de 1580 pb. MM - marcador molecular “GeneRuler™ 1kb DNA ladder” (Fermenta Life Sciences).....56

Figura 27. Análise dos clones recombinantes pelas técnicas de PCR (A) e pela restrição enzimática (B). Canaleta 1-10: clones resultantes do processo de transformação com o fragmento gênico de 508 pb. MM - marcador molecular “GeneRuler™ 1kb DNA ladder” (Fermentas Life Sciences).....57

Figura 28. Resultado da análise de similaridade do fragmento do gene *cry8* (628 pb) por meio da ferramenta Blastn utilizando o banco de dados GenBank58

Figura 29. Resultado da análise de similaridade do fragmento do gene *cry8* (1580 pb) por meio da ferramenta Blastn utilizando o banco de dados GenBank59

Figura 30. Resultado da análise de similaridade do fragmento do gene *cry8* (508 pb) por meio da ferramenta Blastn utilizando o banco de dados GenBank60

Figura 31. Esquema ilustrando a utilização dos iniciadores Cry8-C7 (d) e Cry8-C7 (r) e a obtenção da sequência completa do novo gene *cry8* pela estratégia de “primer walking”. Em destaque: os códons de iniciação (ATG) em azul e finalização do gene (TAA) em vermelho61

Figura 32. Eletroforograma evidenciando o produto de amplificação obtido por PCR com a utilização dos oligonucleotídeos Cry8-C7 (d) e Cry8-C7 (r). Canaleta 1: BT_I622; CN: controle negativo da reação. MM - marcador molecular “GeneRuler™ 1kb DNA ladder” (Fermentas Life Sciences).....62

Figura 33. Análise dos clones recombinantes pelas técnicas de PCR (A) e pela restrição enzimática (B). Canaleta 1-12: clones resultantes do processo de transformação com o fragmento gênico de 510 pb. MM - marcador molecular “GeneRuler™ 1kb DNA ladder” (Fermentas Life Sciences).....63

Figura 34. Resultado da análise de similaridade do fragmento do gene *cry8* (510 pb) por meio da ferramenta Blastn.....63

Figura 35. Eletroforograma evidenciando a amplificação do novo gene *cry8* por PCR com a utilização dos oligonucleotídeos Gral-cry8 (d) e Cry8-C7 (r). Canaleta 1: BT_I622; CN: controle negativo da reação. MM - marcador molecular “GeneRuler™ 1kb DNA ladder” (Fermentas Life Sciences).....64

Figura 36. Sequência de nucleotídeos do novo gene *cry8* proveniente do isolado BT_I62265

Figura 37. Resultado da análise de similaridade da sequência completa do gene *cry8* (BT_I622) por meio da ferramenta Blastn. Em amarelo estão destacadas as substituições de nucleotídeos66

- Figura 38.** Alinhamento da sequência deduzida de aminoácidos da proteína Cry8 oriunda do isolado BT_I622 com a proteína Cry8Ba1 (BLASTp). Em destaque: regiões de aminoácidos distintas (em cinza), substituições de aa (em amarelo) e ausência de resíduos de aminoácidos nas sequências da nova proteína (em vermelho) e de Cry8Ba1 (em verde).....68
- Figura 39.** Fase aberta de leitura (ORF) do novo gene *cry8* de BT_I62270
- Figura 40.** Sequência deduzida da proteína Cry8 de BT_I622 pelo programa ORF FINDER (NCBI). Em destaque: códon de início da tradução gênica (ATG) (em verde), metioninas presentes na sequência proteica (em azul) e códon de finalização do gene (TAA) (em vermelho).....70
- Figura 41.** Domínios conservados da nova proteína Cry8 de *B. thuringiensis*.....74
- Figura 42.** Análise filogenética de proteínas Cry8 (coleóptero-específicas). O filograma foi construído pelo método de “Neighbor-joining” utilizando os alinhamentos múltiplos resultantes do alinhamento realizado pelo programa CLUSTALW. A árvore foi gerada pelo programa MEGA4. As sequências utilizadas na análise foram adquiridas do banco do NCBI. O número representado nas ramificações indica os valores de “Bootstrap” (em porcentagem) obtidos em 1000 repetições75
- Figura 43.** Larvas de *S. levis* mortas devido a ingestão da nova proteína Cry8 de BT_I62277

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Oligonucleotídeos gerais para o gene <i>cry8</i> (coleóptero-específico)	23
Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores universais: SP6 e T7	29
Tabela 3. Iniciadores específicos elaborados para a estratégia de “primer walking”	33
Tabela 4. Programas de PCR utilizados na amplificação dos fragmentos do gene <i>cry8</i> presente no isolado BT_I622	34

NOVO GENE *cry8* DE *Bacillus thuringiensis*: CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE AO BICUDO DA CANA-DE-AÇÚCAR, *Sphenophorus levis* VAURIE, 1978 (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)

RESUMO – A caracterização molecular de 46 isolados de *Bacillus thuringiensis* foi realizada por meio da técnica de PCR com os oligonucleotídeos iniciadores gerais Gral-cry8(d)/Gral-cry8(r), resultando na identificação do isolado BT_I622 como portador do gene *cry8* (coleóptero-específico). O fragmento obtido de aproximadamente 376 pares de base (pb), localizado na porção inicial do gene, foi clonado em vetor pGEM[®]-T Easy, sequenciado e analisado por bioinformática. A determinação da sequência completa do gene *cry8* presente no isolado BT_I622, foi realizada pela estratégia de “primer walking” com a utilização de oligonucleotídeos específicos. Os iniciadores foram elaborados através do programa Primer3, com base nas sequências de genes *cry8* depositadas no banco de dados público GenBank (NCBI) e, por meio da análise das sequências geradas com o par de oligonucleotídeos gerais utilizados inicialmente na caracterização dos isolados. As amplificações com diferentes combinações de iniciadores resultaram na obtenção de fragmentos em torno de 1420, 3302, 628, 1580, 508 e 510 pb, os quais foram clonados, sequenciados e analisados pelos programas Phred/Phrap/Consed visando a montagem do gene. A sequência contendo 3531 pb foi comparada ao GenBank pela ferramenta BLASTn, apresentando 98% de similaridade com o gene *cry8Ka2*. Paralelamente, a sequência de aminoácidos deduzida (1176 aa) revelou 75% de identidade com a proteína Cry8Ba1 na análise com o algoritmo BLASTp, demonstrando que o isolado BT_I622 é portador de um novo gene *cry8*. Os bioensaios indicaram que as larvas de *Sphenophorus levis* são sensíveis a nova proteína Cry8 de *B. thuringiensis*.

Palavras-Chave: BT_I622, “primer walking”, sequenciamento, bioensaio.

**NEW GENE *cry8* OF *Bacillus thuringiensis*: CHARACTERIZATION AND
EVALUATION OF PATHOGENICITY TOWARDS THE SUGARCANE WEEVIL
Sphenophorus levis VAURIE, 1978 (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)**

SUMMARY – The molecular characterization of 46 *Bacillus thuringiensis* isolates was carried out using the PCR technique with primers designed to detect *cry8* genes (Gral-cry8(d)/Gral-cry8(r)), resulting in the identification of the isolate BT_1622 as a *cry8* gene carrier (coleopteran specific). The ca. 376 base pairs (bp) fragment obtained was located in the initial part of the gene, which was cloned into the plasmid pGEM[®]-T Easy, sequenced and analyzed by bioinformatics. The complete sequence determination of this gene found within isolate BT_1622 was done using the “primer walking” strategy. The primers were designed using the software Primer3, comparing to previously sequenced *cry8* genes found in the public database GenBank (NCBI) and analyzing the sequences generated with the pair of general primers used initially in the characterization of isolates. The amplifications with different primer combinations resulted other fragments of this gene with 1,420; 3,302; 628; 1,580; 508 and 510 bp, which were cloned, sequenced and analyzed using the software Phred/Phrap/Consed to obtain the full gene. The 3,531 bp sequence was compared to the GenBank using the BLASTn tool, and showed 98% of similarity with the gene *cry8Ka2*. Also, the deduced amino acid sequence (1,176 amino acids) showed 75% identity to the Cry8Ba1 using the algorithm BLASTp, demonstrating that the isolate BT_1622 carries a new *cry8* gene. The bioassay results indicated that the *Sphenophorus levis* larvae are sensitive to the new Cry8 protein of *B. thuringiensis*.

Keywords: BT_1622, “primer walking”, sequencing, bioassay.

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma planta alógama presente em regiões tropicais e subtropicais, cuja importância socioeconômica está relacionada com a produção de açúcar e álcool, os quais geram divisas, empregos e riquezas aos países produtores da cultura. Dentre eles, o Brasil se destaca no cenário mundial como maior produtor de cana-de-açúcar, seguido da Índia, China e Tailândia. Segundo levantamento realizado pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2011), a produção nacional de cana-de-açúcar para a safra 2011/2012 está estimada em 76,03 toneladas por hectare, numa área de 8,4 milhões de hectares. Entre as regiões produtoras da cana, o estado de São Paulo responde por 52,8% (4,46 milhões de hectares), sendo considerado o maior produtor sucroalcooleiro do Brasil.

No entanto, devido a incidência de insetos-praga sobre a cultura, há uma redução significativa nos valores de produtividade, principalmente quando os danos são causados pelo bicudo da cana-de-açúcar, *Sphenophorus levis* Vaurie (1978) (DEGASPARI et al., 1987). O curculionídeo *S. levis* constitui uma das principais pragas de solo que afetam o sistema radicular da cana-de-açúcar, reduzindo consideravelmente a produtividade agrícola, longevidade dos canaviais e a qualidade da matéria prima (ALMEIDA & STINGEL, 2005).

O ciclo biológico desse inseto é constituído por ovo, larva, pupa e adulto. As fêmeas ovipositam na base dos colmos, por meio de uma perfuração realizada com o rostro, inserindo os ovos na planta de cana. Após a eclosão, as larvas cavam galerias nos internódios basais dos colmos para se alimentarem, causando grandes prejuízos no interior da planta, ou seja, perdas de 20 a 30 toneladas de cana-de-açúcar por hectare/ano. A fase de pupa compreende um período de 7 a 15 dias, originando posteriormente o adulto de coloração castanho-escuro medindo cerca de 10 mm (ARRIGONI, 2010).

Atualmente, o controle de larvas de *S. levis* é realizado por dois diferentes métodos de manejo: o controle químico e o cultural. Devido ao comportamento e habitat das larvas, o emprego de inseticidas químicos não proporciona um controle satisfatório da praga, sendo necessária a adoção do método de controle cultural. Esse método consiste no emprego do eliminador mecânico de soqueira para a remoção das plantas infectadas pelo bicudo *S. levis*, apresentando resultados significativos de controle, porém, apenas para o primeiro corte da cana. Em decorrência da próxima safra, os rizomas da planta são preservados no solo favorecendo o aumento da incidência de *S. levis* na cultura, sem que haja mecanismos que possam frear o aumento da população dessas pragas na área (PRECETTI & ARRIGONI, 1990).

Diante do exposto, a busca por métodos de controle mais eficazes e seguros é de suma importância para o manejo integrado do bicudo *S. levis*. Com isso os agentes de controle biológico aparecem como uma alternativa econômica e ecologicamente viável. Dentre os agentes microbianos utilizados como controle biológico, a bactéria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) se destaca por produzir inclusões cristalinas denominadas δ -endotoxinas (proteínas Cry), as quais exibem atividade entomopatogênica aos imaturos de insetos pertencentes às ordens Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hemiptera, Hymenoptera, Mallophaga, além de nematóides, protozoários e ácaros. *B. thuringiensis* é uma bactéria Gram-positiva pertencente à família *Bacillaceae*, aeróbia, anaeróbia facultativa, catalase positiva, quimioheterótrofa, ubíqua, sendo que suas células vegetativas possuem forma de bastonete (GLARE & O'CALLAGHAM, 2000).

A utilização das proteínas Cry tem demonstrado ser uma estratégia valiosa no controle biológico de insetos-praga, especialmente com o desenvolvimento de plantas transgênicas expressando genes de *B. thuringiensis*, incentivando pesquisadores e empresas no desenvolvimento de programas de prospecção visando a descoberta de novos genes *cry*. Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo a caracterização molecular de 46 isolados de *B. thuringiensis* visando a obtenção de novos genes da classe *cry8* (coleóptero-específicos) pela

estratégia de “primer walking”, os quais podem ser utilizados futuramente na transformação de plantas de cana-de-açúcar para o controle do bicudo *S. levis* Vaurie, 1978.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)

A cana-de-açúcar é uma planta alógama pertencente à família Poaceae (Gramineae), tribo Andropogoneae e gênero *Saccharum*, cujo centro de origem está localizado no sudeste asiático, entre as regiões da Indonésia e Nova Guiné (MATSUOKA et al., 2005). No Brasil, a cana foi introduzida por Martin Afonso de Souza em 1532, a partir de mudas trazidas provavelmente da Ilha da Madeira (CESNIK & MIOCQUE, 2004).

O gênero *Saccharum* é composto por seis espécies, sendo duas selvagens, *Saccharum spontaneum* Linnaeus (2n=40-128) e *S. robustum* Brandes e Jeswiet ex Grassl (2n=60-205) e quatro formas cultivadas, *S. officinarum* Linnaeus (2n=80), *S. barberi* Jeswiet (2n=81-124), *S. sinense* Roxb. (2n=111-120) e *S. edule* Hassk. (2n=60-80) (DANIELS & ROACH, 1987). O melhoramento genético da espécie cultivada *S. officinarum* (cana nobre) tem sido realizado através de sucessivos cruzamentos interespecíficos com as espécies acima citadas, resultando em cultivares modernas (*Saccharum* spp.) com alto grau de poliploidia (100 a 130 cromossomos) (VETTORE et al., 2003).

A cana-de-açúcar é considerada uma planta perene com metabolismo C4, a qual apresenta elevada taxa fotossintética e eficiência na conversão de energia radiante em química (SEGATO et al., 2006). O cultivo de cana ocorre predominantemente em regiões tropicais e subtropicais. O desenvolvimento da planta de cana-de-açúcar se dá em forma de touceira, no qual a parte aérea é constituída pelos colmos, folhas, inflorescências e frutos, enquanto que a subterrânea é composta por raízes e rizomas. A inflorescência é uma panícula aberta, chamada de bandeira ou flecha. Os rizomas são formados por nódios (nós), internódios (entrenós) e gemas responsáveis pela concepção dos perfilhos na touceira (MOZAMBANI et al., 2006). Fatores ambientais como temperatura,

disponibilidade hídrica e de nutrientes e insolação são de fundamental importância para o desenvolvimento da cultura da cana-de-açúcar.

O ciclo da cana oriunda de muda, ou seja, que receberá o primeiro corte, é denominada ciclo da cana-planta, sendo que o plantio pode ser realizado em dois períodos distintos. O primeiro período compreende a plantação da cana no início da estação chuvosa e quente, entre os meses de setembro a novembro, sendo que seu ciclo apresenta uma duração média de 12 meses (cana de ano). No segundo período, a cana é plantada entre os meses de janeiro a abril, intermediando a estação chuvosa e quente e o outono e, possui um ciclo variável de 14 a 21 meses, conforme data de plantio e época de maturação da variedade (cana de ano e meio). Devido a rebrota, a cana cultivada posteriormente é chamada de cana-soca e as colheitas de ressocas (AFONSI et al., 1987).

Dentre os produtores do setor sucroalcooleiro, o Brasil se destaca no cenário mundial como maior produtor da cultura. De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2011), a área cultivada com cana-de-açúcar no país continua em expansão, sendo estimada em 8,4 milhões de hectares na safra de 2011/12. Os maiores índices de aumento ocorrem em São Paulo, Mato Grosso do Sul, Goiás, e Minas Gerais. O estado de São Paulo continua sendo o maior produtor brasileiro com 52,8% (4.458,31 mil hectares), seguido de Minas Gerais com 8,77% (740,15 mil hectares), Goiás com 7,97% (673,38 mil hectares), Paraná com 7,33% (619,36 mil hectares), Mato Grosso do Sul com 5,69% (480,86 mil hectares), Alagoas com 5,34% (450,75 mil hectares) e Pernambuco com 3,84% (324,03 mil hectares) (Figura 1). A produtividade média desta safra está estimada em 76,03 toneladas por hectare, 1,8% menor que a safra anterior (2010/11), que foi de 77,45 toneladas por hectare, devido a estiagem prolongada (abril a novembro), principalmente na região Centro-Oeste e Sudeste.

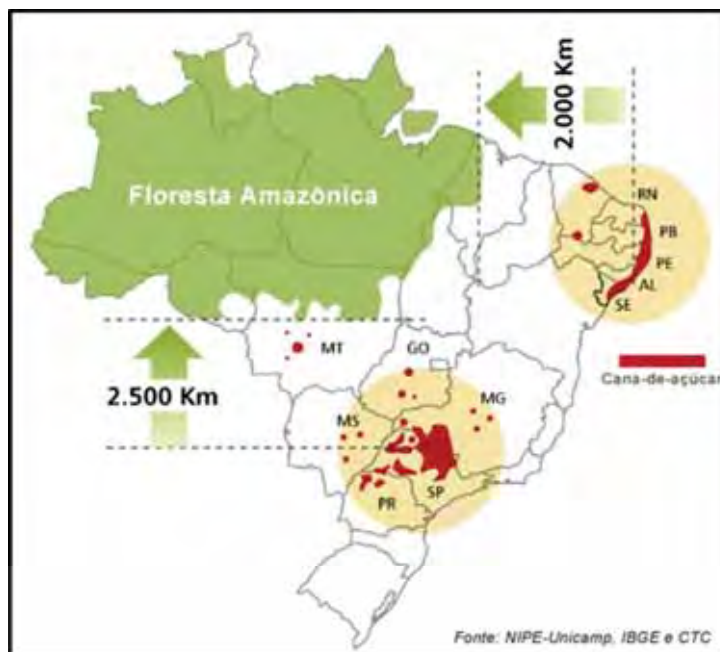


Figura 1. Principais regiões produtoras da cana-de-açúcar no Brasil e localização das usinas (em vermelho). Fonte: <<http://www.unica.com.br/content/>>. 16 julho 2011.

A previsão do total de cana moída para a safra de 2011/12 é de 641.982 mil toneladas, com incremento de 2,9% em relação a safra 2010/11, que foi de 623.905,1 mil toneladas, o que resultará na produção de aproximadamente 27 bilhões de litros de etanol (8,7 bilhões de litros de etanol anidro e 18,4 bilhões de litros de etanol hidratado) e, 31 milhões de toneladas de açúcar (CONAB, 2011). Além da produção de açúcar e etanol (anidro e hidratado), produtos como aguardente e os subprodutos bagaço (geração de energia), vinhaça, torta de filtro, ração animal, fertilizantes, produtos aglomerados e embalagens são obtidos a partir da cana-de-açúcar.

Apesar do sucesso como líder na produção mundial de açúcar e etanol, o Brasil enfrenta sérios problemas em relação a incidência de insetos-praga na cultura da cana. Dentre as principais pragas identificadas nos canaviais brasileiros, destacam-se: as brocas *Diatraea saccharalis* Fabricius, 1794 (Lepidoptera: Crambidae) e *Telchin licus licus* Drury, 1773 (Lepidoptera:

Castiniidae), a cigarrinha-das-raízes, *Mahanarva fimbriolata* Stal, 1854 (Hemiptera: Cercopidae), formigas cortadeiras e as pragas de solo, como cupins e os besouros *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae) e *Migdolus fryanus* Westwood, 1863 (Coleoptera: Vesperidae).

2.2. *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae)

O bicudo ou gorgulho da cana-de-açúcar *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae) constitui uma das principais pragas de solo que afetam o sistema radicular da cana-de-açúcar, reduzindo consideravelmente a produtividade agrícola, longevidade dos canaviais e a qualidade da matéria prima (DEGASPARI et al., 1987; PRECETTI & ARRIGONI, 1990; ALMEIDA & STINGEL, 2005). A primeira menção dessa praga atacando a cultura da cana-de-açúcar no Brasil foi feita em 1977, no município de Santa Bárbara D'Oeste - SP, sendo que sua expansão a diferentes estados foi intensificada a partir do ano de 2000 (ALMEIDA, 2005).

Segundo levantamento realizado em 2010 pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), Piracicaba - SP, foram confirmados focos de *S. levis* em 131 municípios de 4 estados distintos, ou seja, 126 municípios em São Paulo, 3 em Minas Gerais, 1 no Paraná e 1 no Mato Grosso do Sul. Dentre os fatores que podem estar contribuindo para a rápida disseminação do inseto-praga, pode-se citar: a identificação tardia da área infestada, a falta de um conjunto de medidas necessárias para o Manejo Integrado de Pragas (MIP), as dificuldades no controle da praga, o transporte de mudas de cana-de-açúcar infectadas, o avanço da área de colheita de cana sem queima (cana crua) associada a ferti-irrigação com vinhaça, o que propicia melhores condições de sobrevivência ao gorgulho (ARRIGONI, 2010).

O bicudo *S. levis* possui metamorfose completa, ou seja, o ciclo biológico deste inseto é composto por ovo, larva, pupa e adulto (Figura 2). As fêmeas perfuram a base dos colmos com o rostro e depositam em torno de 60 a 70 ovos,

que ficarão incubados por um período de 7 a 12 dias. Os ovos apresentam forma elíptica com as dimensões 0,27 mm de comprimento e 0,10 mm de largura (DEGASPARI et al., 1987).

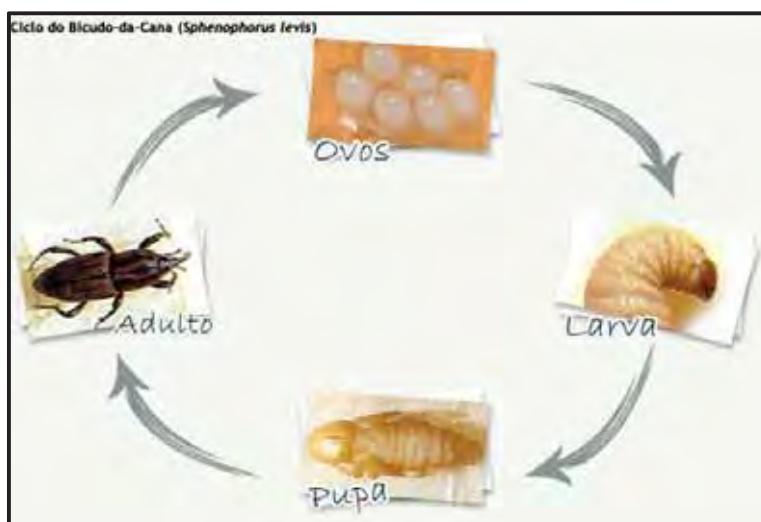


Figura 2. Ciclo biológico do bicudo da cana-de-açúcar *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae). Disponível em: <http://galeria.cuiket.com.br/foto/ciclo-do-bicudo-da-cana-sphenophorus-levis_5225.html>. 16 julho 2011.

As larvas de *S. levis* são ápodas, de coloração esbranquiçada e possuem grande sensibilidade ao calor e a desidratação. Essas larvas se alimentam da planta de cana por meio da escavação de galerias circulares e longitudinais nos internódios basais dos colmos, resultando em grandes danos para a cultura (Figura 3). As plantas atacadas apresentam o amarelecimento e secagem de folhas e, consequentemente, a morte de perfilhos, os quais podem ser facilmente extraídos da touceira. Decorrente da infestação da praga, os prejuízos (perdas) na produtividade agrícola podem variar de 20 a 30 toneladas de cana-de-açúcar por hectare/ano, reduzindo a qualidade da matéria prima e longevidade do canavial, além do aumento nos custos de produção devido às ações de monitoramento e controle do inseto. O período larval está compreendido entre 30 e 60 dias. Pouco antes de alcançar a fase de pupa, a larva abre uma galeria e se instala, cessando

sua alimentação e movimentação. As pupas permanecem nesse estágio de vida de 7 a 15 dias, dando origem posteriormente ao adulto de coloração castanho-escuro com manchas pretas no dorso e listras longitudinais nos élitros, os quais apresentam longevidade de 200 a 220 dias. Geralmente, os machos medem em média 9,7 mm de comprimento e as fêmeas 11,9 mm (PRECETTI & ARRIGONI, 1990; ALMEIDA, 2005; ARRIGONI, 2010).



Figura 3. Danos gerados pelas larvas de *S. levis* nos colmos e rizomas da cana-de-açúcar. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=39#>. 16 julho 2011.

O inseto adulto apresenta uma capacidade de voo restrita, o que caracteriza sua baixa capacidade de dispersão, sugerindo desta forma que a disseminação de *S. levis* está diretamente relacionada com o transporte de mudas infectadas através da malha rodoviária (DEGASPARI et al., 1987; DINARDO-MIRANDA, 2005). Ocorrem dois picos populacionais para os adultos, sendo um menor no mês de outubro e novembro, e o principal em fevereiro e março. A mesma dinâmica também é observada para as larvas, com um pico populacional em dezembro e outro, de maior intensidade, em junho-julho. Esses dados sugerem a ocorrência de duas gerações anuais da praga, em épocas bem definidas (DEGASPARI et al., 1987; PRECETTI & ARRIGONI, 1990). Assim, nos períodos de maio a novembro, especialmente nos três primeiros meses, ocorrem

os maiores danos nas plantas de cana-de-açúcar, visto que a fase larval é a que causa maior prejuízo à cultura (ALMEIDA, 2005).

Em virtude do comportamento e do habitat das larvas e adultos de *S. levis*, os métodos de controle tradicionais envolvendo a utilização de inseticidas químicos não apresentam resultados satisfatórios na redução da população de insetos, sendo necessária a adoção de métodos de controle culturais, ou seja, o emprego do Eliminador Mecânico de Soqueira (EMS). A destruição das soqueiras apresenta-se como um método relativamente satisfatório para o primeiro corte de cana, ou seja, a partir deste período como o rizoma da cana permanece no solo para a próxima safra, a incidência da praga aumenta consideravelmente, não havendo mecanismos que possam frear a disseminação do curculionídeo no canavial (PRECETTI & ARRIGONI, 1990). Sendo assim, a utilização de plantas transgênicas expressando genes *cry* (coleóptero-específicos) de *Bacillus thuringiensis* surge como uma nova tática de manejo, proporcionando uma forma mais direcionada e eficaz no controle do bicudo *S. levis*.

2.3. *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis (Bt) é uma bactéria Gram-positiva pertencente à família *Bacillaceae*, catalase positiva, aeróbica, podendo também crescer em anaerobiose (GLARE & O'CALLAGHAM, 2000), de hábito quimioheterotrófico, com temperatura ideal de crescimento em torno de $30 \pm 2^{\circ} \text{C}$ (MORAES & CAPALBO, 1986). Suas células vegetativas possuem forma de bastonete, medindo cerca de 1,0 a 2,0 μm de largura por 3,0 a 5,0 μm de comprimento. Esta bactéria é geralmente móvel, possuindo flagelos peritríquios (GLARE & O'CALLAGHAM, 2000).

Em condições nutricionais desfavoráveis, a divisão celular é interrompida e inicia-se o processo de esporulação, o qual resulta na produção de inclusões proteicas (proteínas Cry ou δ -endotoxinas) que se acumulam no compartimento da célula-mãe correspondendo a cerca de 20-30% do peso seco da célula

esporulada. O cristal é liberado juntamente com o esporo durante o processo de lise celular (LERECLUS et al., 1989). O formato do cristal é determinado pela composição e estrutura das proteínas Cry, podendo estas apresentar-se na forma bipiramidal, cubóide, ovóide, rombóide, esférica ou sem uma forma definida (HABIB & ANDRADE, 1998, de MAAGD et al., 2003).

A atividade entomopatogênica da bactéria *B. thuringiensis* está intimamente relacionada à produção dos cristais, os quais possuem em sua constituição um agregado de proteínas codificadas pelos diferentes tipos de genes *cry*, exibindo atividade tóxica para diversas ordens de insetos (Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hemiptera, Hymenoptera, Mallophaga), além de nematóides, protozoários e ácaros (HÖFTE & WHITELEY, 1989; FEITELSON et al., 1992; SCHNEPF et al., 1998). Além das proteínas Cry, outros fatores de virulência como as proteínas Cyt e Vip, α -exotoxinas, β -exotoxinas, hemolisinas, enterotoxinas e quitinases são produzidas por *B. thuringiensis*. É uma bactéria ubíqua podendo ser encontrada no solo, restos de insetos, grãos armazenados, teias de aranha e superfície de plantas (de MAAGD et al, 2001).

2.3.1. δ -endotoxinas

As δ -endotoxinas são proteínas que apresentam-se na forma de protoxina composta por uma massa molecular que pode variar de 130-140 kDa, as quais necessitam ser ativadas pelas proteases presentes no intestino médio dos insetos em condições específicas de pH, resultando na liberação de um fragmento tóxico (PIGOTT & ELLAR, 2007). As protoxinas possuem duas regiões distintas: a primeira relacionada à toxicidade ao inseto-praga e apresentando variabilidade, sendo denominada porção amino-terminal (N-Terminal) e, a segunda, portadora da região conservada existente entre as proteínas Cry e, está associada à estrutura, formação e solubilização do cristal, conhecida como porção carboxi-terminal (C-terminal) (HÖFTE & WHITELEY, 1989; SCHNEPF et al., 1998).

A análise de regiões altamente conservadas por meio do alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas Cry, revelou a presença de cinco blocos conservados (1, 2, 3, 4 e 5) na região codificadora da proteína (HÖFTE & WHITELEY, 1989; de MAAGD et al., 2001) (Figura 4). O bloco 1 está constituído pela α -hélice central (α -5) do domínio I, o bloco 2 é composto pela região de interface entre os domínios I e II, o bloco 3 é formado pela região de ligação entre os domínios II e III, o bloco 4 é composto pela folha- β central e, o bloco 5 constitui a porção final do domínio III (de MAAGD et al., 2001).

Paralelamente, outros três blocos (6, 7 e 8) localizados na região C-terminal da protoxina foram descritos por SCHNEPF et al. (1998), porém não estão embutidos na fração tóxica da proteína. Estes dados são de extrema importância para o conhecimento das relações evolucionárias e para a comprovação da atividade biológica das proteínas Cry, as quais são constituídas por famílias com blocos similares e mecanismos de ação semelhantes (MONNERAT & BRAVO, 2000).

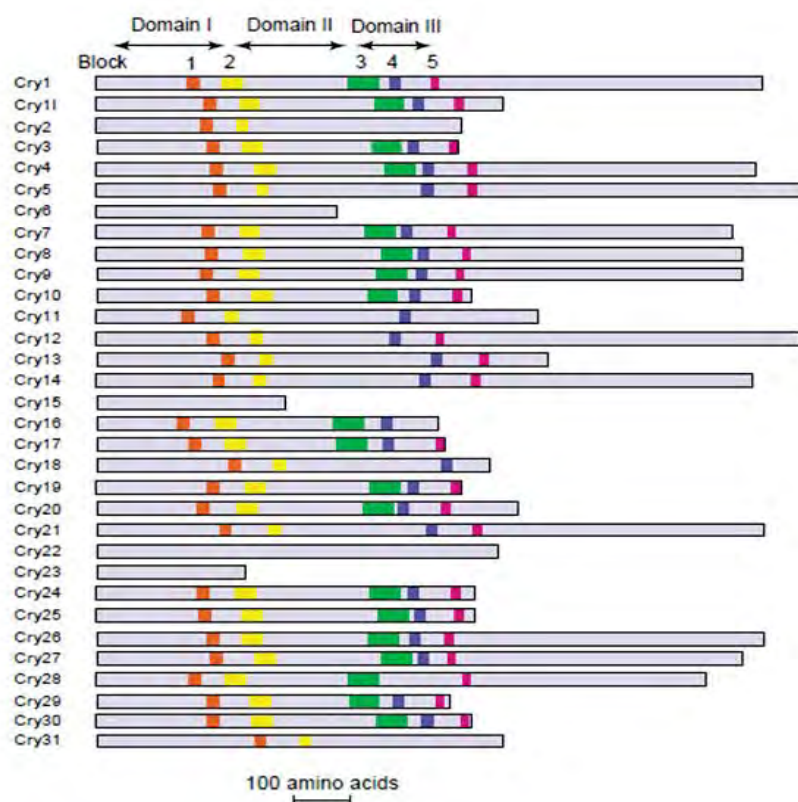


Figura 4. Estrutura primária das δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*: localização dos domínios e blocos conservados (de MAAGD et al., 2001).

O primeiro grupo é constituído pelas proteínas Cry1, Cry3, Cry4, Cry7, Cry8, Cry9, Cry10, Cry16, Cry17, Cry19 e Cry20 que são muito relacionados entre si e suas toxinas ativas compartilham cinco blocos de significativa homologia (LERECLUS et al., 1993). O segundo grupo é formado pelas proteínas Cry5, Cry12, Cry13, Cry14 e Cry21, as quais apresentam homologia entre os blocos 1, 2, 4 e 5, variabilidade no segundo bloco e o terceiro bloco totalmente ausente (SCHNEPF et al., 1998). Já o terceiro grupo é composto pelas proteínas Cry2, Cry11 e Cry18, possui o bloco 1 e uma variante truncada do bloco2 (LERECLUS et al., 1989).

2.3.2. Estrutura tridimensional das proteínas Cry

A estrutura tridimensional de oito proteínas Cry foi resolvida por cristalografia e difração de raios-X: Cry1Aa (GROCHULSKI et al., 1995), Cry1Ac (LI et al., 2001), Cry2Aa (MORSE et al., 2001), Cry3Aa (LI et al., 1991), Cry3Bb1 (GALITSKY et al., 2001), Cry4Aa (BOONSERM et al., 2006), Cry4Ba (BOONSERM et al., 2005) e Cry8Ea1 (GUO et al., 2009) (Figura 5).

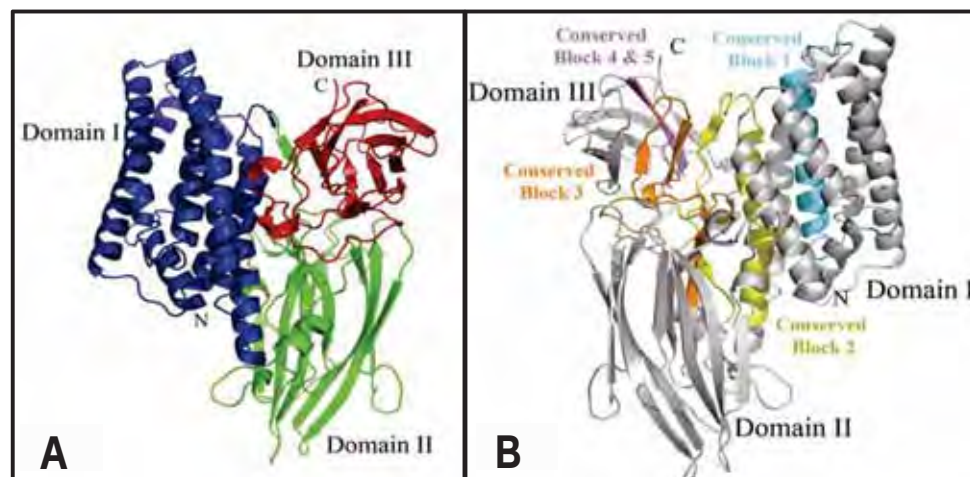


Figura 5. Estrutura tridimensional da proteína Cry8Ea1 evidenciando (A) domínios I (em azul), II (em verde) e III (em vermelho). (B) Blocos conservados: 1 (azul), 2 (amarelo), 3 (laranja), 4 e 5 (violeta) e a porção restante em cinza.

Apesar das diferenças existentes entre as sequências de aminoácidos, todas as proteínas Cry compartilham uma estrutura comum, formada por três domínios. O domínio I (N-terminal) consiste de 7 α -hélices, sendo 6 hélices anfipáticas (α -1, α -2, α -3, α -4, α -6 e α -7) circundado por uma hélice central (α -5) que é hidrofóbica, e está envolvido na inserção da proteína na membrana e formação do poro. O domínio II é formado por três folhas- β antiparalelas ao redor de um cerne hidrofóbico, finalizando em alças no ápice da molécula, formando os loops 1, 2 e 3 (RUKMINI et al., 2000; de MAAGD et al., 2003). O domínio III (C-terminal) é constituído de duas folhas- β antiparalelas, formando um β -sanduíche. Os domínios II e III estão envolvidos no reconhecimento e ligação da proteína ativada ao receptor. Acredita-se que o domínio III esteja fortemente envolvido com a estabilidade estrutural (de MAAGD et al., 2001), protegendo a toxina de degradação durante o processamento proteolítico e controlando as interações toxina-toxina, podendo também agir em conjunto com o domínio I, na formação de poros (RUKMINI et al., 2000).

2.3.3. Mecanismo de ação da proteína cristal

A maioria dos estudos sobre o modo de ação das proteínas Cry foi realizado com insetos da ordem Lepidoptera (KNOWLES & DOW, 1993), o qual é constituído por várias etapas. Primeiramente, os cristais de *B. thuringiensis* são ingeridos por larvas suscetíveis e em seguida, solubilizados no intestino médio do inseto (Figura 6). Diferenças na solubilização podem contribuir para determinar as alterações no grau de toxicidade entre as proteínas Cry (ARONSON et al., 1991).

A ativação das protoxinas em polipeptídios tóxicos ocorre devido ao processamento realizado pelas proteases intestinais, na qual a porção C-terminal das protoxinas é removida, restando somente a parte ativa (N-terminal) (MONNERAT & BRAVO, 2000). A clivagem proteolítica é uma etapa essencial para a determinação da especificidade, sendo que a principal protease digestiva

para os insetos da ordem Lepidoptera e Diptera é a serino-protease, enquanto que para coleópteros são as cisteíno e aspártico-proteases (de MAAGD et al., 2001).

As proteínas ativas ligam-se a receptores localizados nas microvilosidades das células colunares do epitélio intestinal das larvas de insetos suscetíveis das ordens Lepidoptera (HOFMANN et al., 1988), Coleoptera (BRAVO et al., 1992) e Diptera (HOFTE & WHITELEY, 1989). Em geral, quatro receptores proteicos têm sido descritos para lepidópteros como possíveis moléculas para ligação das proteínas Cry as células do epitélio intestinal dos insetos suscetíveis: uma proteína do tipo caderina (CADR), uma aminopeptidase-N ancorada a glicosilfosfatidil-inositol (GPI), uma fosfatase alcalina ancorada a glicosilfosfatidil-inositol (GPI) e, um glicoconjugado de 270 kDa (BRAVO et al., 2007).

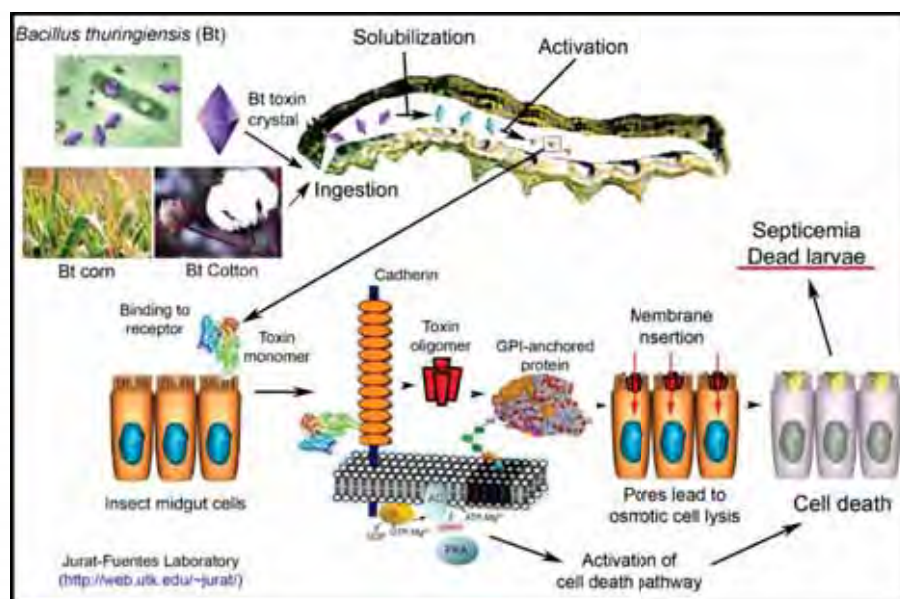


Figura 6. Modo de ação das proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis*. Fonte: <<http://web.utk.edu/~jurat/Btresearchtable.html>>. 16 julho 2011.

Em seguida, a proteína se une rápida e irreversivelmente a membrana plasmática das células epiteliais, promovendo a abertura ou formação de poros e, consequentemente, um desequilíbrio osmótico entre o meio intra e extracelular,

aumentando a permeabilidade das microvilosidades a cátions, ânions e água (VAN RIE et al., 1989; SCHNEPF et al., 1998; de MAAGD et al., 2001; BRAVO et al., 2005). Com a desestruturação da membrana e destruição das células ali presentes, os esporos encontram condições favoráveis para germinação na hemolinfa, levando o inseto a morte pelos processos de inanição e septicemia (MONNERAT & BRAVO, 2000).

2.4. Transformação genética de plantas

Estudos envolvendo o melhoramento genético tem resultado no incremento da produtividade de várias espécies cultivadas, através da utilização de abordagens tecnológicas que visam a obtenção de uma planta com ganho genético maior após a seleção (QUECINI & VIEIRA, 2001). Sendo assim, a tecnologia do DNA recombinante constitui numa importante ferramenta para o isolamento de genes e sua posterior inserção estável no genoma do hospedeiro, resultando num indivíduo igual ao receptor, porém dotado de uma nova característica. Dentre as características agrônômicas de grande interesse comercial, a resistência a insetos se destaca no cenário mundial devido à utilização de genes *cry* da bactéria *B. thuringiensis* na transformação de diferentes culturas.

Existem diversas técnicas de transformação genética de plantas, as quais estão agrupadas basicamente em duas categorias: transferência indireta (inserção do DNA exógeno ao genoma da planta por meio de um vetor biológico) e direta (introdução do material genético no vegetal através de processos físico-bioquímicos).

A transformação indireta consiste numa estratégia simples, eficiente e barata para transformar plantas e é mediada por bactérias do gênero *Agrobacterium*, a qual resulta na produção de plantas geneticamente modificadas com um número limitado de cópias do transgene. As espécies comumente utilizadas, *Agrobacterium tumefaciens* e *Agrobacterium rhizogenes*, são bactérias fitopatogênicas de solo, Gram-negativas, pertencentes à família

Rhizobiaceae e são causadoras de doenças em dicotiledôneas (galhas da coroa e raiz em cabeleira, respectivamente) (DE BLOCK, 1993).

O processo de transferência de fragmentos do DNA bacteriano (T-DNA) das agrobactérias para a célula vegetal é mediado pela interação planta-patógeno (REAM & GELVIN, 1996). Localizados dentro do T-DNA ("transferred DNA") que foi transferido para a planta, estão presentes os genes envolvidos na biossíntese constitutiva de fitohormônios (auxinas e citocininas), os quais são responsáveis pela alteração no desenvolvimento normal do tecido da planta, ocasionando a formação do tumor. Além dos fitohormônios, estas bactérias também possuem oncogenes para a síntese de açúcares e aminoácidos (opinas), que são fundamentais para a sobrevivência da bactéria (OGER et al., 1997). A presença de sequências com 25 pares de base (pb) delimitando as extremidades do T-DNA possibilita a transferência do mesmo (WANG et al., 1984). Sendo assim, a transferência do T-DNA para a célula vegetal ocorre a partir do momento em que compostos fenólicos são liberados pela região lesionada da planta ativando a região de virulência (vir) que dará início ao processo (STACHEL et al, 1985). Os vetores utilizados para a transformação via *A. tumefaciens* possuem os genes de virulência (vir) e são desarmados, ou seja, não possuem oncogenes em seu plasmídeo (REAM & GELMIN, 1996). Dessa forma, *A. tumefaciens* é utilizada como vetor de transformação, onde o fragmento de T-DNA é eliminado e substituído por um gene de interesse (SACIOTO, 2003).

Em relação a transferência direta, os principais métodos utilizados são: a eletroporação e a biobalística. A transformação por eletroporação consiste na indução temporária de poros nas membranas celulares dos protoplastos, os quais são produzidos por um campo elétrico e permitem a passagem de íons e moléculas (DNA). Esse método é pouco utilizado para monocotiledôneas (BIRCH, 1997). Já a transformação pelo método de biobalística consiste na aceleração de micropartículas que atravessam a parede celular e membrana plasmática, carregando o DNA para o interior da célula (FERREIRA et al., 2004). Para tal procedimento, são utilizados microprojéteis de ouro ou tungstênio, com diâmetro em torno de 1 µm, nos quais são impregnadas as moléculas de DNA.

Os microprojéteis transportam as moléculas de DNA fixadas em sua superfície, as quais são posteriormente liberadas, sendo que poucas atingem o núcleo e conseguem integrar o genoma da célula vegetal (KLEIN et al., 1987).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Caracterizar isolados de *Bacillus thuringiensis* portadores de novos genes *cry8* (coleóptero-específicos) e avaliar sua toxicidade a larvas de 2^o ínstar de *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae).

3.2. Objetivos específicos

- Detectar a presença do gene *cry8* em isolados de *B. thuringiensis*;
- Caracterizar o fragmento coleóptero-específico;
- Determinar a sequência completa do novo gene *cry8*;
- Avaliar a toxicidade da proteína Cry de BT_I622 solubilizada.

4. MATERIAL & MÉTODOS

As análises moleculares do presente estudo foram realizadas no Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA), do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Campus de Jaboticabal, SP. A elaboração do ensaio de patogenicidade com larvas do bicudo da cana-de-açúcar, *Sphenophorus levis* Vaurie (1978) (Coleoptera: Curculionidae), foi realizada junto ao Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), Piracicaba - SP. Posteriormente, o bioensaio foi armazenado em sala climatizada do Laboratório de Biologia e Criação de Insetos (LBCI), do Departamento de Fitossanidade, FCAV/UNESP, Jaboticabal - SP.

4.1. Linhagens e isolados de *Bacillus thuringiensis*

Foram utilizados 46 isolados brasileiros de *Bacillus thuringiensis* (BT_I89, BT_I93, BT_I97, BT_I99, BT_I101, BT_I106, BT_I107, BT_I115, BT_I116, BT_I121, BT_I124, BT_I129, BT_I142, BT_I147, BT_I54, BT_I177, BT_I178, BT_I187, BT_I466, BT_I583, BT_I606, BT_I622, BT_I629, BT_I689, BT_I704, BT_I706, BT_I710, BT_I750, BT_I788, BT_I906, BT_I912, BT_I913, BT_I915, BT_I918, BT_I921, BT_I923, BT_I939, BT_I940, BT_I968, BT_I1039, BT_I1100, BT_I1101, BT_I1108, BT_I1110, BT_I1144) + BT_I1204, pertencentes à coleção do LGBBA, FCAV/UNESP, Jaboticabal - SP.

Os isolados supracitados entre parênteses foram previamente selecionados por CÍCERO (2007), durante o desenvolvimento do Projeto Temático “Manejo de pragas com a utilização de genes *cry* de *B. thuringiensis*” (FAPESP - Proc. 03/09539-8). A caracterização molecular de 1128 isolados de *B. thuringiensis* foi realizada por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), com os pares de iniciadores Cry3Aa LGBBA, Cry3Ba Conservado, Cry3Bb Conservado,

Cry7 Geral Conservado, Cry7 Geral LGBBA, Cry8 Geral Conservado, Cry9 Geral Conservado, Cry9 Geral LGBBA, Cry35Aa Conservado, Cry35Ba Conservado, resultando na seleção de 45 isolados coleóptero-específicos, os quais foram testados posteriormente em bioensaios com larvas de *S. levis* (CÍCERO, 2007).

Além dos isolados, foram utilizadas as linhagens padrão *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* (controle positivo - ordem Coleoptera) e *B. thuringiensis* var. *israelensis* (controle negativo - ordem Diptera), presentes também na coleção do LGBBA.

4.2. Condições de cultivo das células bacterianas

Os isolados e linhagens padrão de *B. thuringiensis* encontram-se estocados em fitas de papel filtro impregnadas com uma suspensão de esporos e mantidos em BOD a 10°C. Para o início dos experimentos, fitas foram submersas em tubos criogênicos contendo água grau Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA) estéril no dia anterior à repicagem, obtendo-se uma suspensão de esporos. Uma alíquota dessa solução foi adicionada em placas de Petri contendo meio de cultura Ágar Nutriente (NA) (Acumedia, Baltimore, USA) (3,0 g/L de extrato de carne; 5,0 g/L de peptona bacteriológica e 15,0 g/L de ágar), semeada com o auxílio de uma alça de platina esterilizada e, incubadas em estufa a 30°C por 16 horas.

As colônias obtidas foram inoculadas em 100 ml de caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) (Himedia, Mumbai, Índia) (10,0 g/L de peptona; 2,0 g/L de glicose; 5,0 g/L de cloreto de sódio e 2,5 g/L de fosfato dissódico) e submetidas a agitação de 200 rpm, por 4 horas e 30 minutos, a 30°C, em agitador orbital (Forma Scientific, modelo 420, Marietta, OH, USA).

4.3. Extração e quantificação do DNA genômico de *B. thuringiensis*

O DNA genômico das células de *B. thuringiensis* foi obtido pelo protocolo descrito por WILSON (1987), o qual nos forneceu um material de alto peso molecular e elevado grau de pureza.

As culturas bacterianas provenientes de 100 ml de meio BHI foram centrifugadas a 7.740 x g, por 15 minutos, a 4°C (Beckman J2-21, rotor JA-20, Brea, CA, USA). Os precipitados obtidos por centrifugação foram ressuspensos em 9,5 ml de TE [Tris HCl 10 mM; EDTA 1 mM (pH 7,4)] adicionado de lisozima (20 mg/ml) e homogeneizados em aparelho do tipo “vórtex”. Em seguida, adicionaram-se 500 µl de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% e 50 µl de proteinase K (20 mg/ml) às preparações, agitando-as suavemente, sendo após incubadas em banho-maria por 1 hora, a 37°C. Posteriormente, acrescentou-se 1,8 ml de NaCl (5 M) aos tubos, os quais foram homogeneizados por inversão. Após este procedimento, 1,5 ml da solução contendo CTAB/NaCl foi adicionada às preparações, misturadas e, logo em seguida, incubadas em banho-maria por 20 minutos, a 65°C.

As desproteínizações foram feitas utilizando-se um volume de 13,35 ml de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e centrifugadas a 9.800 x g, por 10 minutos, a 4°C (Beckman J2-21, rotor JA-20, Brea, CA, USA). Os sobrenadantes foram coletados com o auxílio de uma pipetadora e 20 ml de isopropanol absoluto gelado foram adicionados para a precipitação do DNA. Posteriormente, adicionaram-se 2 ml de etanol 70% gelado às amostras, sendo em seguida, submetidas a centrifugação a 9.800 x g, por 10 minutos, a 4°C (Beckman J2-21, rotor JA-20, Brea, CA, USA). O sobrenadante foi descartado e novamente foi realizada uma lavagem com etanol 70%. Os precipitados obtidos por centrifugação a 9.800 x g, por 10 minutos, a 4°C (Beckman J2-21, rotor JA-20, Brea, CA, USA) foram dissolvidos em 1 ml de TE, ao qual foi adicionado 25 µl de RNase (10 mg/ml) e incubados por 1 hora, a 37°C. O material genético foi armazenado em freezer (-20°C) até o momento do uso.

As amostras contendo DNA genômico foram quantificadas em aparelho NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). A análise da integridade dos ácidos nucleicos foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1,5%, utilizando tampão TEB 1X [Tris 89 mM, EDTA 2,5 mM e Ácido Bórico 89 mM (pH 8,2)] contendo brometo de etídeo (0,5 µg/ml). Uma

alíquota do DNA foi misturada com 3 µl de tampão de amostra (“loading buffer” - 0,5% de azul de bromofenol, 50% de glicerol), submetida à eletroforese horizontal com uma corrente elétrica de 70 V, por 2 horas, e visualizadas sob luz ultravioleta (UV) e fotodocumentadas em equipamento fotodocumentador Gel Doc 2000, utilizando-se do software Quantity-one (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Em todas as eletroforeses foi utilizada uma amostra de DNA com fragmentos de tamanhos conhecidos “GeneRuler™ 1kb DNA ladder” (Fermentas Life Sciences, Burlington, ON, Canada), como referência de migração eletroforética.

4.4. Detecção de genes *cry8* (coleóptero-específicos) por PCR

As 48 amostras de DNA genômico (46 isolados + 02 linhagens padrão) foram submetidas à técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para a identificação dos isolados portadores do gene *cry8*, por meio da utilização dos oligonucleotídeos iniciadores gerais (BRAVO et al., 1998) (Tabela 1), os quais foram sintetizados pela empresa Invitrogen™ Life Technologies (Carlsbad, CA, USA).

Tabela 1. Oligonucleotídeos gerais para o gene *cry8* (coleóptero-específico).

Iniciadores	Sequências	Produto (pb)	Referência
Gral-cry8 (d)	5' ATGAGTCCAAATAATCTAAATG 3'	~ 376	Bravo et al., 1998
Gral-cry8 (r)	5' TTTGATTAATGAGTTCTTCCACTCG 3'		

(d): direto; (r): reverso.

As reações de amplificação foram conduzidas em um volume final de 20 µl contendo: 20 ng de DNA molde; 0,25 mM de uma solução de dNTPs (10 mM); 2,0 mM de MgCl₂; 0,5 µl de cada oligonucleotídeo iniciador (10 pmoles); 2,0 U da enzima Platinum® *Taq* DNA Polymerase Invitrogen™ Life Technologies (Carlsbad, CA, USA); 2,0 µl da solução tampão para a reação de PCR (10X) [200 mM Tris;

500 mM KCl (pH 8,4)] e água grau Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA) previamente esterilizada (q.s.p. 20 µl).

Em todos os lotes de reação foi realizado um controle negativo no qual a quantidade de DNA foi substituída por água grau Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA) estéril. Foram utilizadas como referência as linhagens padrão *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* (controle positivo para a ordem Coleoptera) e *B. thuringiensis* var. *israelensis* como controle negativo, visto que esta linhagem atua sobre insetos da ordem Diptera.

As reações foram realizadas em aparelho termociclador PTC-100 “Programmable Thermal Controller” (MJ Research, Watertown, MA, USA), equipado com circuito “Hot Bonnet”, sendo o programa constituído por um passo inicial de desnaturação de 5 minutos a 94°C e 30 ciclos, consistindo de um passo de desnaturação a 94°C por 1 minuto; pareamento dos oligonucleotídeos a 49°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto e, ao final dos ciclos, um passo extra de extensão a 72°C por 5 minutos. Ao fim do programa foi adicionado um passo para a manutenção da amostra a 4°C até a retirada dos tubos do termociclador.

Após a realização das amplificações, adicionaram-se 3 µl de tampão de amostra (0,5% de azul de bromofenol, 50% de glicerol) aos produtos da PCR. Um volume de 10 µl de cada amostra foi aplicado em gel de agarose a 1,5%, contendo brometo de etídeo (0,5 µg/ml) e submetido à eletroforese em cuba horizontal, por 2 h, a 50 V, conduzida em tampão TEB 1X [Tris 89 mM, EDTA 2,5 mM e Ácido Bórico 89 mM (pH 8,2)]. Em todas as eletroforeses realizadas foi adotado o emprego de uma amostra de DNA “GeneRuler™ 1kb DNA ladder” (Fermentas Life Sciences, Burlington, ON, Canada), com fragmentos de tamanhos conhecidos, a qual serviu como referência de migração eletroforética para verificação dos tamanhos dos fragmentos obtidos nas reações de amplificação. Posteriormente, os géis de agarose foram visualizados sob luz UV e fotodocumentados em equipamento fotodocumentador Gel Doc 2000 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), por meio do *software Quantity-one*.

4.5. Clonagem do fragmento gênico em vetor pGEM®-T Easy

O fragmento resultante da amplificação pela PCR foi usado como molde para a clonagem utilizando-se o Kit pGEM®-T Easy Vector System I (Promega, Madison, WI, USA).

O plasmídeo pGEM®-T Easy é um vetor que possui em sua construção elementos primordiais no processo de clonagem, tais como: um gene que confere resistência ao antibiótico ampicilina (marcador de seleção), uma origem de replicação e, um sítio múltiplo de clonagem contendo os promotores SP6 e T7, o qual encontra-se inserido dentro do gene codificador da enzima β -galactosidase (*lacZ*) (gene repórter). Esse vetor possui extremidades coesivas constituídas por timidinas que facilitam a ligação do inserto pela enzima T4 DNA ligase, visto que, a maioria das DNA polimerases termina a polimerização pela adição de bases adenina nas terminações 3' do fragmento amplificado (Figura 7).

A reação de ligação (vetor + fragmento) foi conduzida em um volume final de 10 μ l, conforme recomendações do fabricante: 2,0 μ l do produto de PCR; 5,0 μ l de 2X Rapid Ligation Buffer T4 DNA ligase; 1,0 μ l do vetor pGEM®-T Easy (50 ng/ μ l); 1,0 μ l da enzima T4 DNA ligase (3 U/ μ l) e água grau Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA) previamente esterilizada (q.s.p. 10 μ l). A reação foi mantida em aparelho termociclador a 4°C por 16 horas.

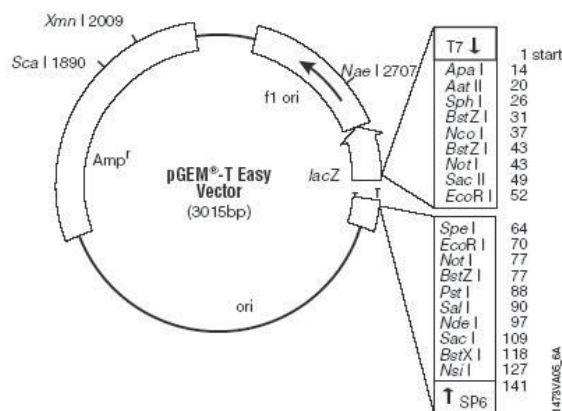


Figura 7. Mapa do vetor de clonagem pGEM®-T Easy (Promega®).

4.6. Transformação de células de *Escherichia coli* com DNA plasmidial

A transformação bacteriana foi realizada pelo método de choque térmico (HANAHAN, 1983) utilizando células de *E. coli* DH10B competentes, juntamente com a reação de ligação anteriormente obtida no processo de clonagem.

Um microtubo contendo 200 µl de células de *E. coli* DH10B competentes foi previamente descongelado em gelo. Em seguida, foram adicionados 10 µl da reação de ligação ao tubo de células, sendo este cuidadosamente homogeneizado e incubado em gelo por 30 minutos. Após este período, as células foram submetidas ao choque térmico em banho-maria a 42°C, por 90 segundos. Imediatamente, retornou-se o tubo no gelo por 2 minutos. Dentro do fluxo laminar, adicionaram-se 800 µl de meio SOC (meio Luria-Bertani (LB) [10 g/L de triptona; 5 g/L de extrato de levedura; 5 g/L de NaCl] + KCl 2 M; MgSO₄ 1 M; MgCl₂ 1 M; glicose 1 M) ao tubo com células e, todo o conteúdo foi transferido para um tubo cônico tipo Falcon® com capacidade de 15 ml, sendo este incubado a 37°C, por 1 hora, sob agitação de 110 rpm (Forma Scientific, modelo 420, Marietta, OH, USA), para recuperação das células. Decorrente o período de incubação e com o auxílio da alça de Drigalsk, 100 µl da suspensão de células foram semeados sobre placas contendo meio de cultura LB (10 g/L de triptona; 5 g/L de extrato de levedura; 5 g/L de NaCl; 15 g/L de ágar) acrescido de ampicilina (50 µg/ml) e da solução de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo + N, N' dimetilformamida) (20 µg/ml). As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 16 horas.

A identificação fenotípica da presença ou ausência da β-galactosidase pode ser executada por meio do uso de um análogo da lactose (X-Gal), o qual é degradado pela enzima β-galactosidase num produto de coloração azul escuro. Se o X-Gal for adicionado ao meio de cultura junto com ampicilina, as colônias não recombinantes, formadas por células que sintetizam β-galactosidase, terão coloração azul, enquanto que as recombinantes, que tiveram o gene *lacZ* interrompido e incapazes de produzir β-galactosidase, serão brancas.

Sendo assim, as colônias bacterianas (coloração branca) resultantes do processo de transformação, foram coletadas com a ajuda de palitos estéreis e inoculadas separadamente em 3 ml de meio LB (10 g/L de triptona; 5 g/L de extrato de levedura; 5 g/L de NaCl) contendo o antibiótico ampicilina (50 µg/ml), sendo incubadas em agitador orbital a 37°C, por 16 horas, a 200 rpm (Forma Scientific, modelo 420, Marietta, OH, USA). Uma alíquota de 700 µl de cada clone foi transferida para tubos criogênicos contendo glicerol 100% e estocados em freezer a -80°C. Posteriormente, 1,5 ml da cultura bacteriana foi centrifugada a 15.294 x g, por 2 minutos, a 25°C (Eppendorf 5804R, rotor FA 45-30-11, Hamburg, Germany) para a obtenção do pellet bacteriano (aglomerado de células) e em seguida, utilizados na extração de DNA plasmidial.

4.7. Minipreparação de DNA plasmidial

A obtenção do DNA plasmidial das células resultantes do processo de transformação ocorreu pelo método da lise alcalina (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). Inicialmente, os pellets bacterianos foram ressuspensos em 200 µl da solução GET (50 mM glicose; 25 mM Tris-HCl [pH 8,0]; 10 mM EDTA), homogeneizados em aparelho do tipo “vórtex” e, mantidos em temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, adicionaram-se 200 µl da solução II (0,2 N NaOH; 1% SDS) aos tubos, misturando-os gentilmente por inversão sendo após colocados em gelo por 5 minutos. Posteriormente, foram adicionados 150 µl da solução III (KOAc 3 M), os microtubos foram homogeneizados e mantidos em gelo por 5 minutos. Os tubos foram centrifugados a 15.294 x g, por 5 minutos, a 4°C (Eppendorf 5804R, rotor FA 45-30-11, Hamburg, Germany).

Aproximadamente, 400 µl do sobrenadante foram transferidos para um tubo estéril (com capacidade de 1,5 ml) e em seguida, adicionaram-se 500 µl de clorofórmio-álcool-isoamílico (24:1) homogeneizando-os em aparelho tipo “vórtex” por 2 minutos, sendo submetidos à centrifugação a 15.294 x g, por 5 minutos, a 4°C (Eppendorf 5804R, rotor FA 45-30-11, Hamburg, Germany).

Um volume aproximado de 500 µl da fase aquosa foi transferido para um tubo tipo Eppendorf® novo (1,5 ml), no qual foram adicionados 875 µl de etanol 100%, homogeneizados por inversão e mantidos em gelo por 5 minutos, para posterior centrifugação a 15.294 x g, por 5 minutos, a 4°C (Eppendorf 5804R, rotor FA 45-30-11, Hamburg, Germany). Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 1 ml de etanol 70% e os microtubos foram centrifugados por 5 minutos, a 4°C, a 15.294 x g (Eppendorf 5804R, rotor FA 45-30-11, Hamburg, Germany). O sobrenadante foi descartado e os tubos permaneceram em temperatura ambiente para evaporação de todo líquido que ainda restara nas paredes. Os pellets de DNA foram ressuspensos em 30 µl da solução de TE/RNase (10 mg/ml), mantidos em banho-maria por 30 minutos e armazenados a -20°C.

As amostras de DNA plasmidial foram quantificadas em aparelho NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

4.8. Análise dos clones por PCR e restrição enzimática

A confirmação da presença do fragmento de DNA de interesse dentro do plasmídeo foi realizada pelas técnicas de PCR e restrição enzimática.

4.8.1. Confirmação dos clones recombinantes pela técnica de PCR

A análise dos clones recombinantes por PCR foi desenvolvida com a utilização dos oligonucleotídeos iniciadores universais denominados SP6 e T7 (IDT, Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA) (Tabela 2), os quais possuem sítios localizados dentro do gene *lacZ* do vetor pGEM®-T Easy.

Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores universais: SP6 e T7.

Iniciadores	Sequências
SP6	5' ATTTAGGTGACACTATAG 3'
T7	5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'

As reações de amplificação foram conduzidas em um volume final de 25 µl contendo: 0,5 µl de DNA plasmidial (300 ng/µl); 0,25 mM de uma solução de dNTPs (10 mM); 1,5 mM de MgCl₂; 1,25 µl de cada oligonucleotídeo iniciador (10 pmoles); 2,0 U da enzima Platinum® *Taq* DNA Polymerase Invitrogen™ Life Technologies (Carlsbad, CA, USA); 2,5 µl da solução tampão para a reação de PCR (10X) [200 mM Tris; 500 mM KCl (pH 8,4)] e água destilada Milli-Q previamente esterilizada (q.s.p. 25 µl). Em todos os lotes de reação foi realizado um controle negativo no qual a quantidade de DNA foi substituída por água grau Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA) previamente esterilizada.

As reações foram realizadas em aparelho termociclador PTC-100 “Programmable Thermal Controller” (MJ Research, Watertown, MA, USA), onde foi utilizado o seguinte programa: um passo inicial de desnaturação de 2 minutos a 95°C e 40 ciclos consistindo de um passo de desnaturação a 95°C por 45 segundos; pareamento dos oligonucleotídeos a 48°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos e, ao final dos ciclos, um passo extra de extensão a 72°C por 10 minutos. Ao término do programa, as amostras foram mantidas a 4°C até a retirada dos tubos do termociclador.

4.8.2. Confirmação dos clones recombinantes por restrição

A análise dos clones recombinantes pelo método de restrição enzimática foi realizada com o auxílio da enzima *Eco*RI (Fermentas Life Sciences, Burlington, ON, Canada) visando a liberação do inserto, visto que o vetor pGEM®-T Easy (Promega, Madison, WI, USA) possui palíndromos para a enzima *Eco*RI dentro do

seu sítio múltiplo de clonagem. Para tal procedimento, foi utilizada a enzima *EcoRI* (Fermentas Life Sciences, Burlington, ON, Canada), juntamente com o DNA plasmidial dos clones. A reação de restrição foi realizada num volume final de 20 μ l, conforme recomendações do fabricante: 2,0 μ l de tampão *EcoRI*; 3,0 μ l de DNA plasmidial (300 ng/ μ l); 1,0 μ l da enzima *EcoRI* e água grau Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA) estéril (q.s.p. 20 μ l). As amostras foram mantidas em banho-maria a 37°C por 1 hora e 30 minutos.

Após a realização da PCR e da restrição enzimática, foram adicionados aos tubos 3 μ l de tampão de amostra (0,5% de azul de bromofenol, 50% de glicerol). Um volume de 10 μ l de cada amostra foi aplicado em gel de agarose a 1,5%, contendo brometo de etídeo (0,5 μ g/ml) e submetido à eletroforese em cuba horizontal, por 2 horas, a 70 V, conduzida em tampão TEB 1X [Tris 89 mM, EDTA 2,5 mM e Acido Bórico 89 mM (pH 8,2)]. Adotou-se o emprego de uma amostra de DNA, com fragmentos de tamanhos conhecidos, "GeneRuler™ 1kb DNA ladder" (Fermentas Life Sciences, Burlington, ON, Canada), que serviu como referência de migração eletroforética para verificação dos tamanhos dos fragmentos. Em seguida, o gel de agarose foi visualizado sob luz UV e fotodocumentado em equipamento fotodocumentador Gel Doc 2000 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), por meio do software Quantity-one.

4.9. Sequenciamento e análise dos clones positivos para o gene *cry8*

O sequenciamento dos fragmentos clonados no vetor pGEM®-T Easy foi realizado pelo método da terminação da cadeia por dideoxinucleotídeo, utilizando-se sequenciador automático. Foram utilizados para o sequenciamento, os oligonucleotídeos iniciadores SP6 e T7 (Tabela 2), conforme constituição do vetor. As reações de sequenciamento foram realizadas num volume final de 10 μ l, sendo constituídas por: 100 ng de DNA plasmidial; 3,0 μ l da solução tampão para a reação de PCR (2,5X) [200 mM Tris (pH 9,0); 5 mM MgCl₂]; 1,0 μ l de

oligonucleotídeo (10 pmol); 1,0 µl de DYEnamic™ ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (GE Healthcare, Fairfield, CT, USA) e água grau Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA) esterilizada (q.s.p. 10 µl).

As reações foram realizadas em aparelho termociclador PTC-100 “Programmable Thermal Controller” (MJ Research, Watertown, MA, USA), com o seguinte programa: 40 ciclos consistindo de um passo de desnaturação a 95°C por 20 segundos; pareamento dos oligonucleotídeos a 50°C por 15 segundos e extensão a 60°C por 2 minutos. Ao término do programa, as amostras foram mantidas a 4°C até a retirada dos tubos do termociclador.

A purificação e precipitação da reação de sequenciamento foram realizadas de acordo com protocolo proposto pela empresa Applied Biosystems™ Life Technologies (Carlsbad, CA, USA). As amostras foram precipitadas pela adição de 1 µl de EDTA 125 mM (pH 8,0), 1 µl de acetato de sódio 3M (pH 5,2) e 25 µl de etanol 100%. A placa foi selada com adesivo de alumínio, homogeneizada por inversão, incubada por 15 minutos à temperatura ambiente (em local isento de luz) e, centrifugada a 2.254 x g, por 30 minutos, a 4°C (Eppendorf 5804R, rotor A-2-MTP, Hamburg, Germany). Imediatamente, a placa foi invertida sobre papel toalha e o sobrenadante descartado por meio de uma rápida centrifugação a 185 x g. Em seguida, adicionaram-se 35 µl de etanol 70% e uma nova centrifugação foi realizada a 2.254 x g, por 15 minutos, a 4°C (Eppendorf 5804R, rotor A-2-MTP, Hamburg, Germany). O sobrenadante foi descartado através de uma rápida centrifugação a 185 x g e a placa acondicionada em fluxo laminar por 1 hora, em temperatura ambiente, para completa secagem das amostras.

Posteriormente, foram adicionados 10 µl de formamida HiDi (Applied Biosystems™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) às amostras contidas na placa que, por sua vez, foi selada com um suporte de silicone e levada ao termociclador PTC-100 (MJ Research, Watertown, MA, USA) para a desnaturação da dupla fita de DNA a 95°C por 5 minutos. Imediatamente, a mesma foi retirada do aparelho e mantida no gelo por 2 minutos. O sequenciamento automático foi

conduzido em aparelho ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Os cromatogramas obtidos pelo sequenciamento das amostras foram analisados pelos programas Phred (EWING et al., 1998), Phrap (EWING & GREEN, 1998), Consed (GORDON et al., 1998), em sistema operacional Mac OS X. A comparação das sequências FASTA geradas com o banco de dados GenBank do National Center for Biotechnology Information (NCBI), foi realizada pela ferramenta “Basic Local Alignment Search Tool” - BLAST (ALTSCHUL et al., 1997) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). O propósito dessa análise consistiu na verificação da identidade do material sequenciado por meio do grau de similaridade com as sequências depositadas no GenBank.

4.10. Determinação da sequência completa do gene *cry8* pela estratégia de “primer walking”

O sequenciamento do gene *cry8* pela estratégia de “primer walking” foi realizado com a utilização de oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene em estudo (Tabela 3).

Os iniciadores foram elaborados através do programa Primer3 (ROZEN & SKALETSKY, 2000) com base em sequências de genes *cry8* depositadas no banco de dados GenBank (*cry8Aa1* [U04364], *cry8Ba1* [U04365] e *cry8Ca1* [U04366]) e, por meio das sequências obtidas anteriormente (item 4.9) com os oligonucleotídeos iniciadores gerais (Gral-*cry8d*/Gral-*cry8r*) descritos por BRAVO et al. (1998). O alinhamento das sequências FASTA foi realizado pelo programa Kalign (LASSMANN & SONNHAMMER, 2005).

Tabela 3. Iniciadores específicos elaborados para a estratégia de “primer walking”.

Iniciadores	Sequências	Posição no gene	Referências
Gral-cry8 (d)	5' ATGAGTCCAAATAATCTAAATG 3'	1 - 22	Bravo et al., 1998
Gral-cry3 (r)	5' CATCTGTTGTTTCTGGAGGCAAT 3'	1398 - 1420	Ben-Dov et al., 1997
Cry8-C3 (r)	5' GATTGATTTCCACCATCAC 3'	3284 - 3302	Neste estudo
Cry8-C4 (d)	5' GCAGAATACGCAAGGAATAAG 3'	379 - 399	Neste estudo
Cry8-C4 (r)	5' TAGCCGCACTTTCTATAGCC 3'	987 - 1006	Neste estudo
Cry8-C5 (d)	5' TTCCTGGTAAACCAAGTG 3'	1306 - 1323	Neste estudo
Cry8-C5 (r)	5' TCAGCATATAAACGGTCTAC 3'	2866 - 2885	Neste estudo
Cry8-C6 (d)	5' GCTAACAGATCGACTCCAAC 3'	3024 - 3043	Neste estudo
Cry8-C6 (r)	5' TTACTCTACGTCTACAATCAAT 3'	3510 - 3531	Neste estudo
Cry8-C7 (d)	5' TAAATTATCTGCTGGGACCTC 3'	1767 - 1787	Neste estudo
Cry8-C7 (r)	5' CCTTCTACAACCTCAATTCC 3'	2257 - 2276	Neste estudo

(d): direto; (r): reverso.

A verificação da temperatura de Melting (TM), conteúdo C+G e da formação de estruturas secundárias e dímeros nos oligonucleotídeos elaborados, foi feita através do software Sequence Manipulation Suite: PCR Primer Stats (STOTHARD, 2000) (http://bioinformatics.org/sms2/pcr_primer_stats.html). A síntese dos iniciadores foi realizada pela empresa Invitrogen™ Life Technologies (Carlsbad, CA, USA).

As combinações de iniciadores utilizadas para a obtenção dos fragmentos (“contigs”) e consequentemente, a montagem do gene *cry8* de BT_I622 foram: (1) Gral-cry8 (d) (BRAVO et al., 1998) + Gral-cry3 (r) (BEN-DOV et al., 1997); (2) Gral-cry8 (d) (BRAVO et al., 1998) + Cry8-C3 (r); (3) Cry8-C4 (d) + Cry8-C4 (r); (4) Cry8-C5 (d) + Cry8-C5 (r); (5) Cry8-C6 (d) + Cry8-C6 (r); (6) Cry8-C7 (d) + Cry8-C7 (r). A amplificação do gene *cry8* inteiro foi realizada com a utilização dos oligonucleotídeos Gral-cry8 (d) (BRAVO et al., 1998) + Cry8-C6 (r). A predição do tamanho (pb) dos fragmentos amplificados foi realizada com o auxílio do programa pDRAW32 1.0 (AcaClone Software, <http://www.acaclone.com>).

As reações de amplificação foram conduzidas em um volume de 20 µl: 20 ng de DNA; 0,25 mM de uma solução de dNTPs (10 mM); 2,0 mM de MgCl₂; 0,5 µl de cada oligonucleotídeo iniciador (10 pmoles); 2,0 U da enzima Platinum® Taq DNA Polymerase Invitrogen™ Life Technologies (Carlsbad, CA, USA); 2,0 µl da solução tampão para a reação de PCR (10X) [200 mM Tris; 500 mM KCl (pH 8,4)] e água grau Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA) previamente esterilizada (q.s.p. 20 µl). Em todos os lotes foi realizado um controle negativo no qual a quantidade de DNA foi substituída por água grau Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA) estéril.

As reações foram realizadas em aparelho termociclador PTC-100 “Programmable Thermal Controller” (MJ Research, Watertown, MA, USA), sendo que o programa utilizado para cada par de oligonucleotídeos diferiu nos parâmetros temperatura, tempo e quantidade de ciclos (Tabela 4).

Tabela 4. Programas de PCR utilizados na amplificação dos fragmentos do gene *cry8* presente no isolado BT_I622.

Combinações de Oligonucleotídeos iniciadores	Ciclo					
	Desnaturação inicial	Desnaturação	Pareamento	Extensão	nº ciclos	Extensão final
Gral-cry8(d) / Gral-cry3(r)	94°C - 5'	94°C - 1'	49°C - 1'	72°C - 1'	35 x 2	72°C - 5'
Gral-cry8(d) / Cry8-C3(r)	94°C - 5'	94°C - 1'	53°C - 1'	72°C - 3'	35 x 2	72°C - 10'
Cry8-C4(d) / Cry8-C4(r)	94°C - 5'	94°C - 1'	57°C - 1'	72°C - 1'	30 x 2	72°C - 5'
Cry8-C5(d) / Cry8-C5(r)	94°C - 5'	94°C - 1'	52°C - 1'	72°C - 1'	30 x 2	72°C - 5'
Cry8-C6(d) / Cry8-C6(r)	94°C - 5'	94°C - 1'	54°C - 1'	72°C - 1'	30 x 2	72°C - 5'
Cry8-C7(d) / Cry8-C7(r)	94°C - 5'	94°C - 1'	56°C - 1'	72°C - 1'	30 x 2	72°C - 5'
Gral-cry8(d) / Cry8-C6(r)	94°C - 5'	94°C - 1'	50°C - 1'	72°C - 4'	35 x 2	72°C - 10'

Os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, contendo brometo de etídeo (0,5 µg/ml), conduzida em tampão TEB 1X [Tris 89 mM, EDTA 2,5 mM e Acido Bórico 89 mM (pH 8,2)] por 2 horas, a 50 V. Adotou-se o emprego de uma amostra de DNA “GeneRuler™ 1kb DNA ladder” (Fermentas

Life Sciences, Burlington, ON, Canada), com fragmentos de tamanhos conhecidos, a qual serviu como referência de migração eletroforética para verificação do tamanho dos fragmentos obtidos nas reações de amplificação. Os géis de agarose foram visualizados sob luz UV e fotodocumentados em equipamento fotodocumentador Gel Doc 2000 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), por meio do software Quantity-one.

Os produtos de PCR amplificados com os oligonucleotídeos específicos (Tabela 3), que apresentaram bandas inespecíficas, foram purificados a partir do gel de agarose 0,8% com o auxílio do kit PureLink™ Gel Extraction Invitrogen™ Life Technologies (Carlsbad, CA, USA), segundo indicação do fabricante. O DNA de interesse recuperado foi quantificado em aparelho NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) para posterior utilização no processo de clonagem molecular.

Os fragmentos gerados pela PCR com os iniciadores específicos para o gene *cry8* em estudo foram clonados em vetor pGEM®-T Easy (Promega®) e transformados em células de *E. coli* DH10B competentes (itens 4.5 e 4.6). A purificação do DNA plasmidial foi realizada pela metodologia da lise alcalina (SAMBROOK & RUSSEL, 2001) (item 4.7). A confirmação dos clones recombinantes foi realizada pelas técnicas de PCR com os oligonucleotídeos universais SP6 e T7 e por restrição enzimática, conforme item 4.8. As amostras de DNA plasmidial foram quantificadas em aparelho NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

As reações de sequenciamento foram realizadas num volume final de 10 µl, sendo constituídas por: 100 ng de DNA plasmidial; 3,0 µl da solução tampão para a reação de PCR (2,5X) [200 mM Tris (pH 9,0); 5 mM MgCl₂]; 1,0 µl de oligonucleotídeo (10 pmoles); 1,0 µl de DYEnamic™ ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (GE Healthcare GE Healthcare, Fairfield, CT, USA) e água grau Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA) esterilizada (q.s.p. 10 µl).

As reações foram realizadas em aparelho termociclador PTC-100 “Programmable Thermal Controller” (MJ Research, Watertown, MA, USA), onde foi

utilizado o seguinte programa: 40 ciclos consistindo de um passo de desnaturação a 95°C por 20 segundos; pareamento dos oligonucleotídeos a 50°C por 15 segundos e extensão a 60°C por 2 minutos. Ao término do programa, as amostras foram mantidas a 4°C até a retirada dos tubos do termociclador.

As amostras foram precipitadas conforme protocolo descrito pela empresa Applied Biosystems™ Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) (item 4.9). Em seguida, foram adicionados 10 µl de formamida HiDi (Applied Biosystems™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) às amostras contidas na placa que, por sua vez, foi selada com um suporte de silicone e levada ao termociclador PTC-100 (MJ Research, Watertown, MA, USA) para a desnaturação das fitas de DNA a 95°C por 5 minutos. Imediatamente, a placa foi retirada do aparelho e mantida no gelo por 2 minutos. O sequenciamento automático foi conduzido em aparelho ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Os dados obtidos nos sequenciamentos foram submetidos a análise *in silico* pelos programas Phred/Phrap/Consed (EWING et al., 1998; EWING & GREEN, 1998; GORDON et al., 1998) em sistema operacional Mac OS X e, comparados com as sequências de nucleotídeos e aminoácidos presentes no GenBank por meio da ferramenta BLAST (ALTSCHUL et al., 1997), através dos algoritmos BLASTn e BLASTp, respectivamente.

A predição da sequência de aminoácidos do gene *cry8* foi efetuada através do banco de dados SWISS-PROT (<http://www.expasy.ch/tools/dna.html>). A tradução da proteína foi realizada com a utilização do programa ORF Finder (Open Reading Frame Finder) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>), que consiste numa ferramenta de análise gráfica responsável por localizar a região de leitura aberta, traduzindo o DNA em seis “frames” possíveis (+1, +2, +3, -1, -2, -3) e, destacando os códons da metionina (ATG) e o códon de terminação (“stop códon”) presentes na sequência.

A verificação dos domínios conservados na proteína foi feita por meio da ferramenta computacional CD-Search, no banco de dados CDD (Conserved Domain Database) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>). A

análise de alinhamentos múltiplos foi realizada pelo programa CLUSTALW (THOMPSON et al., 1994). A árvore filogenética foi construída com o auxílio do programa MEGA 4.0 (TAMURA et al., 2007), com modelo de comparação “Neighbor-joining” (SAITOU & NEI, 1987), método de distância p. A robustez dos ramos gerados pela árvore foi medida pelo teste probabilístico “Bootstrap” (SITNIKOVA et al., 1995), originado a partir de 1000 repetições.

4.11. Toxicidade de proteínas Cry solubilizadas para larvas de *Sphenophorus levis*

4.11.1. Obtenção das proteínas Cry de *B. thuringiensis*

O isolado de *B. thuringiensis* BT-I622 e a linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* foram inoculados em placas de Petri contendo meio de cultura específico para induzir a esporulação da bactéria *B. thuringiensis*, denominado CCY (tampão fosfato 20X [KH_2PO_4 0,26 M; K_2HPO_4 0,52 M], fonte de carbono [200 mg de L-glutamina; 10 g de caseína hidrolisada; 10 g de bacto casitona; 4 g de extrato de levedura; 6 ml de glicerina], sais CCY [ZnCl_2 0,05 M; $\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,5 M; $\text{MnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,01 M; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,2 M; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$]; 15 g/L de ágar) (STEWART et al., 1981), com o auxílio de uma alça de platina esterilizada e, incubados em estufa a 29°C por 48 horas para a obtenção de colônias isoladas. Após este período, coletou-se uma colônia para a montagem da lâmina e observação da cultura esporulada em microscópio óptico (Leica, Germany).

A colônia obtida para isolado/linhagem foi inoculada separadamente com uma alça de platina estéril em 20 ml de CCY (tampão fosfato 20X [KH_2PO_4 0,26 M; K_2HPO_4 0,52 M], fonte de carbono [200 mg de L-glutamina; 10 g de caseína hidrolisada; 10 g de bacto casitona; 4 g de extrato de levedura; 6 ml de glicerina], sais CCY [ZnCl_2 0,05 M; $\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,5 M; $\text{MnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,01 M; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,2 M; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$]) para o preparo do pré-cultivo e em seguida, submetida à agitação a 180 rpm, por 72 horas, a 29°C. Posterior ao cultivo procedeu-se novamente a

verificação da esporulação das células bacterianas por meio da observação em microscópio (Leica, Germany).

Transcorrido o período de incubação acima, realizou-se a sincronização, processo necessário para destruir possíveis células vegetativas ainda presentes na cultura, por meio da incubação da pré-cultura em banho-maria a 70°C, por 20 minutos. Em seguida, 5 ml do pré-cultivo foram inoculados em 500 ml de CCY para o preparo do inóculo final e, submetidos a agitação a 200 rpm, por 72 horas, a 28°C até completa esporulação, que foi verificada em microscópio óptico (Leica, Germany) através do preparo de lâmina com uma alíquota da cultura de *B. thuringiensis*.

A cultura bacteriana foi centrifugada a 15.300 x g, por 12 minutos, a 4°C (Beckman J2-21, rotor JA-14, Brea, CA, USA). O precipitado foi ressuspensionado em 5 ml de solução A (1 M NaCl; 10 mM EDTA), homogeneizado em “vórtex” e, novamente centrifugado a 15.300 x g, por 12 minutos, a 4°C (Beckman J2-21, rotor JA-14, Brea, CA, USA). Esta etapa foi realizada 3 vezes para a remoção dos esporos e resíduos de meio de cultura presentes no precipitado de células de *B. thuringiensis*. Em seguida, adicionaram-se 5 ml de solução B (10 mM KCl), os quais foram homogeneizados e centrifugados a 12.100 x g, por 12 minutos, a 4°C (Beckman J2-21, rotor JA-20, Brea, CA, USA), para a obtenção do pellet onde estão presentes os cristais proteicos.

A solubilização das proteínas Cry foi realizada pela adição de tampão carbonato 50 mM (pH 10,5) acrescido de Ditioneitol (DTT) (10 mM), sendo incubados em agitador orbital por 2 horas em temperatura ambiente (Forma Scientific, modelo 420, Marietta, OH, USA). Posteriormente, as amostras foram submetidas à centrifugação a 23.700 x g, por 15 minutos, a 4°C (Beckman J2-21, rotor JA-20, Brea, CA, USA). O sobrenadante contendo a proteína cristal foi coletado e quantificado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) para a utilização no bioensaio.

4.11.2. Ensaio de patogenicidade com larvas de *S. levis*

A eficiência da nova proteína Cry8 presente no isolado de *B. thuringiensis* BT_I622, foi verificada através de biensaio com larvas de 2^o ínstar de *S. levis*, provenientes da criação mantida no Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), Piracicaba - SP. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado sendo constituído de seis tratamentos (duas concentrações da proteína proveniente do isolado BT_I622, duas concentrações da proteína da linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* e duas testemunhas - uma contendo apenas o tampão carbonato e a outra água grau Milli-Q [Millipore, Bedford, MA, USA] estéril) e 20 repetições/tratamento.

A montagem do experimento foi realizada junto ao CTC, sendo a dieta artificial, necessária para a manutenção das larvas de *S. levis*, composta pelos seguintes ingredientes: 153 g de caseína, 45 g de sais de Wesson (monofosfato de potássio 31%; carbonato de cálcio 21%; fosfato tricálcico 14,9%; cloreto de potássio 12%; cloreto de sódio 10,5%; sulfato de magnésio 9%; fosfato férrico 1,47%; fluoreto de sódio 0,057%, sulfato de cobre [5H₂O] 0,039%; sulfato de manganês 0,02%; sulfato de potássio e alumínio 0,009%; iodeto de potássio 0,005%), 95 g de açúcar; 135 g de germe de trigo, 40 g de bagaço de cana-de-açúcar, 18 g de ácido ascórbico, 113 g de agarose InvitrogenTM Life Technologies (Carlsbad, CA, USA), 3 ml do antibiótico Wintomylon[®] (ácido nalidíxico), 45 ml de solução vitamínica (via líquida [2000 µg de vitamina B12; 2 ml de H₂O] + via seca [20 mg de biotina; 1000 mg de niacinamida; 1000 mg de pontotenato de cálcio; 500 mg de riboflavina sódica; 250 mg de cloridrato de tiamina; 250 mg de cloridrato de piridoxina; 100 mg de ácido fólico] + 1 L de H₂O), 22 ml da solução de KOH (11,25 g de KOH; água destilada q.s.p. 200 ml), 65 ml de solução B (70 g do conservante Nipagim[®] [metilparabeno], 70 g de ácido ascórbico, 500 ml de álcool 70%).

As proteínas solubilizadas, nas concentrações de 50 e 100 µg/ml, foram incorporadas separadamente à dieta artificial (sob a temperatura de 37°C para que não houvesse a degradação proteica) e em seguida, 8 ml da mistura (dieta + proteína) foram distribuídas em tubos de ensaio de fundo chato nas dimensões 2,4 x 8,5 cm. Após completa solidificação, as larvas foram pesadas e cuidadosamente acondicionadas individualmente dentro de uma cavidade feita na dieta, sendo os tubos vedados com tampões de algodão estéril (Figura 8).

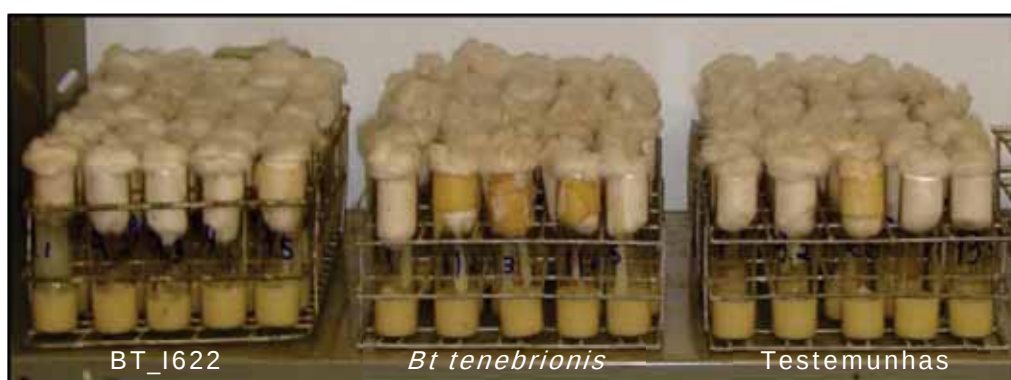


Figura 8. Bioensaio com larvas de 2º ínstar de *Sphenophorus levis* (Coleoptera: Curculionidae) submetidas aos tratamentos com proteínas de *Bacillus thuringiensis*.

Os tubos de ensaio de fundo chato contendo os tratamentos + larvas foram mantidos em sala climatizada do Laboratório de Biologia e Criação de Insetos (LBCI), Departamento de Fitossanidade (FCAV/UNESP - Campus de Jaboticabal), sob temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas, sendo que a avaliação foi realizada no 15º dia posterior à montagem do ensaio, no Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada, do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, desta instituição.

5. RESULTADOS & DISCUSSÃO

5.1. Análise do conteúdo de genes *cry8* em isolados de *B. thuringiensis*

O estudo da variabilidade genética existente em coleções de isolados de *B. thuringiensis* tem sido realizado com grande frequência no mundo, porém poucos são os trabalhos que abordam a detecção de genes coleóptero-específicos, entre eles *cry3*, *cry7* e *cry8* (BEN-DOV et al., 1997; BRAVO et al., 1998; ASANO et al., 2003; URIBE et al., 2003; VILAS-BÔAS & LEMOS, 2004; YU et al., 2006; MARTINS et al., 2007; GAO et al., 2008; NAZARIAN et al., 2009; BAIG et al., 2010; NOGUERA & IBARRA, 2010).

A caracterização molecular do isolado BT_I622 foi realizada inicialmente pela técnica de PCR com a utilização dos oligonucleotídeos iniciadores Gral-cry8 (d) e Gral-cry8 (r) (BRAVO et al., 1998) (Figura 9). Dentre os 46 isolados de *B. thuringiensis* analisados, apenas um (BT_I622) (2,17%) resultou num produto de amplificação de aproximadamente 376 pb (Figura 10). A sequência amplificada está situada na porção inicial do gene, ou seja, na extremidade N-terminal (amino-terminal), estando incluso o códon de iniciação da tradução (ATG), sendo denominada “contig 1”.



Figura 9. Esquema ilustrando a utilização dos iniciadores gerais (Bravo et al., 1998) para a detecção do gene *cry8* em 46 isolados de *B. thuringiensis*.

Em contrapartida, 45 isolados e a linhagem padrão de *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* utilizada como controle positivo para a ordem Coleoptera não apresentaram amplificação para o gene *cry8*. Analisando a origem dos iniciadores, foi possível verificar que, embora os oligonucleotídeos gerais tenham sido elaborados a partir de regiões conservadas dos genes *cry8Aa1* (*B. thuringiensis kumamotoensis* PS50C[a]) (U04364), *cry8Ba1* (*B. thuringiensis kumamotoensis* PS50C[b]) (U04365) e *cry8Ca1* (*B. thuringiensis japonensis* Buibui) (U04366), a linhagem utilizada como referência é constituída por genes da subclasse *cry3*.

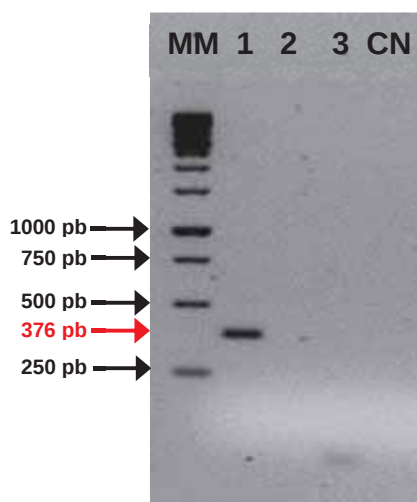


Figura 10. Eletroforograma evidenciando o produto de amplificação obtido por PCR com a utilização de oligonucleotídeos iniciadores gerais para o gene *cry8*. Canaleta 1: BT_I622; 2: *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*; 3: *B. thuringiensis* var. *israelensis*; CN: controle negativo da reação. MM - marcador molecular "GeneRuler™ 1 kb DNA ladder" (Fermentas Life Sciences).

A baixa frequência de isolados de *B. thuringiensis* efetivos a insetos da ordem Coleoptera foi relatada por vários autores. Analisando uma coleção de 1128 isolados de *B. thuringiensis*, provenientes de diferentes regiões brasileiras, CÍCERO (2007) detectou a presença de 45 isolados (3,98%) coleóptero-específicos e dentre eles, apenas três (6,66%) eram portadores de genes da subclasse *cry8*, conforme condições testadas pela autora.

BRAVO et al. (1998) identificaram uma variedade de genes *cry* numa coleção de 496 isolados, advindos de amostras de solo de cinco macrorregiões do México, sendo que 39 (7,86%) possuíam genes *cry* para coleópteros e destes, somente seis (15,38%) eram portadores de genes da classe *cry8*.

PINTO & FIÚZA (2003), por meio da coleta e caracterização de amostras de solos das regiões orizícolas do Rio Grande do Sul, obtiveram um total de 46 isolados de *B. thuringiensis* e, dentre eles, seis (13,04%) apresentaram toxicidade a larvas de *Oryzophagus oryzae* (Costa Lima, 1936) (Coleoptera: Curculionidae), mortalidade esta associada pelos autores devido a presença das proteínas Cry3 e Cry7. Já NAZARIAN et al. (2009), analisando uma coleção de 70 isolados de *B. thuringiensis* provenientes do Irã, detectaram a presença de três cepas (4,28%) codificadoras dos genes *cry7* e *cry8*, as quais foram potencialmente tóxicas a larvas de *Xanthogaleruca luteola* Muller, 1766 (Coleoptera: Chrysomellidae).

O produto de PCR obtido a partir do isolado BT_I622 foi clonado em vetor pGEM®-T Easy (Promega, Madison, WI, USA), transformado em células competentes de *E. coli* DH10B resultando na obtenção de vários clones. A confirmação dos clones recombinantes foi realizada pelas técnicas de PCR com os oligonucleotídeos universais, por meio da amplificação do fragmento de interesse a partir dos promotores SP6 e T7 e, pela utilização da endonuclease de restrição *EcoRI*, responsável pelo corte e consequentemente, a liberação do inserto de ~ 376 pb (Figura 11).

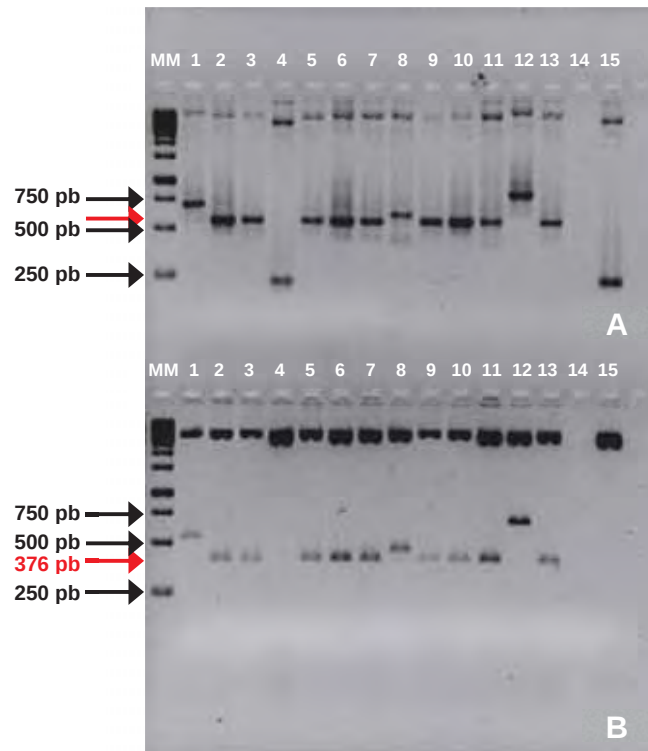


Figura 11. Análise dos clones recombinantes pelas técnicas de PCR (A) e pela restrição enzimática (B). Canaleta 1-15: clones obtidos a partir do isolado BT_I622 com os oligonucleotídeos gerais (Gral-cry8[d] e Gral-cry8[r]). MM - marcador molecular “GeneRuler™ 1kb DNA ladder” (Fermentas Life Sciences).

Os clones positivos, ou seja, os clones portadores do fragmento de PCR (2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 13) obtido com os iniciadores gerais Gral-cry8 (d/r) foram selecionados e sequenciados para a obtenção de sua sequência nucleotídica. A análise realizada pelas ferramentas da bioinformática indicou que o fragmento de aproximadamente 376 pb possui 89% de similaridade com uma região do gene *cry8Ea2* de *B. thuringiensis* B-DLL (EU047597), presente no banco de dados público GenBank (Figura 12).

> [gb|EU047597.1|](#)Bacillus thuringiensis strain B-DLL crystal protein gene, complete cds (*cry8Ea1*)
Length=3495

Score = 457 bits (247), Expect = 3e-128
Identities = 335/378 (89%), Gaps = 4/378 (1%)
Strand=Plus/Plus

```
Query 1      ATGAGTCCAAATAATCTAAATGAATATGAAATTATAGATGCGACACCTTCTACATCTGTA 60
           |||||
Sbjct 1      ATGAGTCCAAATAATCAAAATGAATATGAAATTATAGATATGGCACCTTCTACATCTGTA 60

Query 61     TCTAATGATACTACCAGATACCCCTTTTGCAAATGAACCAACAAATGCGTTACAAAATATG 120
           || |||||
Sbjct 61     TCCAATGATTCTAACAGATACCCCTTTTGCGAGTGATCCAACAAATGCATTACAAAATATG 120

Query 121    AATTATAAGGATTATTTAAGAATGTCTGAAGGTTACGATAGTGAATATGCTGGTTCACCT 180
           |||||
Sbjct 121    AATTATAAAGAGTATTTAAGAATGTCTGAGGGATATGATAGTGAATATTCTGGCTCACCT 180

Query 181    GAAGCATTTTACTAGTGGGCAAGATGCGGTTAAAG-CCGCGATTGGTGTGGTAGGTCA-AA 238
           |||| |||||
Sbjct 181    GAAGTGCTTATTAGTGAGCGAGATGCGGTT-AAGACAGCAATCAGTTTGGTAGGT-ACTA 238

Query 239    TATTGGGGAAATTAGGGGTTCCATTTGTTGGGCCGATTGTGAGCCTATATAGTGCACCTTA 298
           |||| |||||
Sbjct 239    TATTAGGAAAATTAGGAGTTCATTGGTAGGACCGATTGTGAGCCTATATAGTACACTTA 298

Query 299    TTGATGTTTTGTGGCCAGGTGGAAGAGTCAATGGGAAATTTTATGGAACAAGTAGAAG 358
           |||||
Sbjct 299    TTGATGTTTTGTGGCCAGGTGGAAGAGTCAATGGGAAATTTTATGGAACAAGTAGAAG 358

Query 359    CACTCATTAATAAAAAAA 376
           ||||
Sbjct 359    CACTTATTAATCAAAAAA 376
```

Esta estratégia também foi adotada por NOGUERA & IBARRA (2010), os quais elaboraram um sistema composto por três conjuntos de oligonucleotídeos, com base em regiões conservadas da família *cry*, sendo esses iniciadores capazes de amplificar os três domínios presentes nos genes *cry* de *B. thuringiensis* e, conseqüentemente, descobrir novos tipos de genes *cry*.

A extensão da sequência nucleotídica do gene *cry8* de BT_I622 foi iniciada pelo uso dos oligonucleotídeos Gral-cry8 (d) e Gral-cry3 (r) (Figura 13).

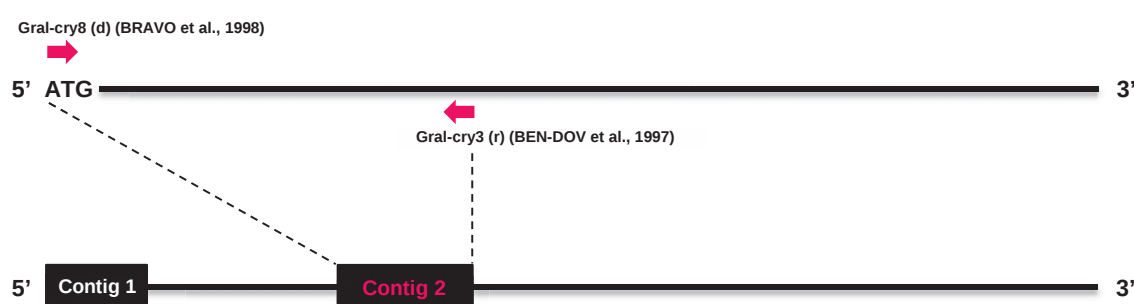


Figura 13. Esquema ilustrando a utilização dos iniciadores Gral-cry8 (d) (Bravo et al., 1998) e Gral-cry3 (r) (Ben-Dov et al., 1997) na estratégia de “primer walking”.

A amplificação por PCR resultou num produto em torno de 1420 pb (Figura 14) para o isolado BT_I622, a qual gerou o “contig 2”.

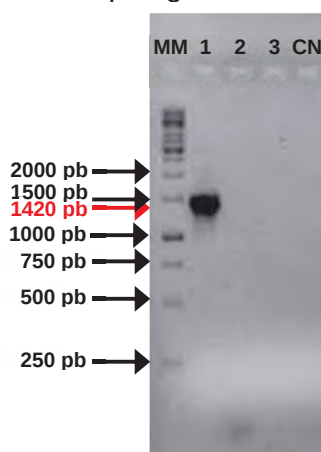


Figura 14. Eletroforograma evidenciando o produto de amplificação obtido por PCR com a utilização dos oligonucleotídeos iniciadores Gral-cry8 (d) (Bravo et al., 1998) e Gral-cry3 (r) (Ben-Dov et al., 1997). Canaleta 1: BT_I622; 2: *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*; 3: *B. thuringiensis* var. *israelensis*; CN: controle negativo da reação. MM - marcador molecular “GeneRuler™ 1kb DNA ladder” (Fermentas Life Sciences).

O fragmento de 1420 pb foi clonado e a confirmação dos clones recombinantes foi realizada, sendo identificados como positivos os clones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9 e 10 (Figura 15). Os eletroferogramas derivados do sequenciamento foram analisados pelos programas Phred, Phrap e Consed (EWING et al., 1998; EWING & GREEN, 1998; GORDON et al., 1998).

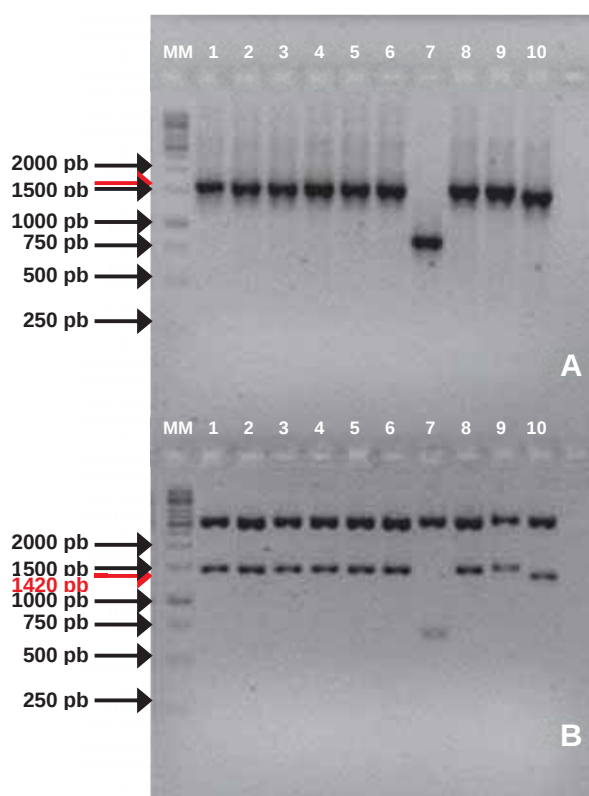


Figura 15. Análise dos clones recombinantes pelas técnicas de PCR (A) e pela restrição enzimática (B). Canaletas 1-10: clones resultantes do processo de transformação com o fragmento gênico de 1420 pb. MM - marcador molecular "GeneRuler™ 1kb DNA ladder" (Fermentas Life Sciences).

A análise realizada com o programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1997), através do algoritmo BLASTn, indicou a similaridade de 83% deste fragmento com o gene *cry8Ba1* (U04365) de *B. thuringiensis kumamotoensis* PS50C(b) (Figura 16).

> [gb|U04365.1|BTU04365](#) *Bacillus thuringiensis kumamotoensis* PS50C(b) CryIII delta-endotoxin gene, partial cds
Length=3507

Score = 1249 bits (676), Expect = 0.0
Identities = 1202/1450 (83%), Gaps = 60/1450 (4%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 1      ATGAGTCCAAATAATCTAAATGAATATGAAATTATAGATGCGACACCTTCTACATCTGTA 60
            |||
Sbjct 1      ATGAGTCCAAATAATCAAAATGAATATGAAATTATAGATGCGACACCTTCTACATCTGTA 60

Query 61     TCTAATGATACTACCAGATACCCTTTTGCAAATGAACCAACAAATGCGTTACAAAATATG 120
            |||
Sbjct 61     TCCAATGATTCTAACAGATACCCTTTTGCGAATGAGCCAACAAATGCGCTACAAAATATG 120

Query 121    AATTATAAGGATTATTTAAGAATGTCTGAAGGTTACGATAGTGAATATGCTGGTTCACCT 180
            |||
Sbjct 121    GATTATAAAGATTATTTAAAAATGTCTGCGGGAAATGTTAGTGAATACCCTGGTTCACCT 180

Query 181    GAAGCATTTACTA-GTGGGCAAGATGCGGTTAAAGCCGCGATTGGTGTGGTAGGTCAAAT 239
            |||
Sbjct 181    GAGGTATTT-CTAAGCGAGCAAGATGCAGTTAAGGCCGCAATTGATATAGTAGGT-AAAT 238

Query 240    -ATTGGGGAAATT-AGGGGTTCCATTTGTTGGGCCGATTGTGAGCCTATATAGTGCA-CT 296
            |||
Sbjct 239    TACTAAC-AGGTTTAGGGGTTCCATTTGTTGGGCCGATAGTGAGTCTTTATACT-CAACT 296

Query 297    TATTGATGTTTTGTGGCC--AGGTGGAAGAGTCAATGGGAAATTTTATGGAACAAGT 353
            |||
Sbjct 297    TATTGATATTCTGTGGCCTTCAAAACAAAAGAGTCAATGGGAAATTTTATGGAACAAGT 356

Query 354    AGAAGCACTCATTAAATAAAAAAATAGCAGAATACGCAAGGAATAAGGCAATTGCAGAATT 413
            |||
Sbjct 357    AGAAGAAGCTCATTAAATCAAAAAAATAGCAGAATATGCAAGGAATAAAGCGCTTCGGAATT 416

Query 414    AGAGGGGTTAGGGAATAACTACAAAATATATTTAACAGCACTTGAAGAATGGCA-GAAAA 472
            |||
Sbjct 417    GGAAGGGCTAGGGAATAATTACCAATTATATCTAACTGCGCTTGAAGAGTGGAAAGAAAA 476

Query 473    ATCCAAGTAGTACAAGAGTCTTACGCGATGTTTCAGAA-TCGATTTGAAATCTTGATAGT 531
            |||
Sbjct 477    -TCCAAATGGTTCAAGAGCCTTACGAGATGTTT-GAAATCGATTTGAAATCCTGGATAGT 534

Query 532    TTATTTACGCAATATATGCCTTCTTTTCGGGT-AGCTGGTTATGAAGTACCATTACTTAC 590
            |||
Sbjct 535    TTATTTACGCAATATATGCCATCTTTTCGAGTGA-CAAAATTTGAAGTACCATTCTTAC 593

Query 591    AGTATATGCGCAA-G-CAGCTAACCTTCATTTACTGTTATTAAAGGATGCTTCAAATTTT 648
            |||
Sbjct 594    AGTATATAC--AATGGCAGCAAACCTACATTTACTTTTATTAAGGGACGCATCAATTTT 651

Query 649    GGAGAAGAATGGGGATTA--ACAGGAAGTGAAGTTAATACCTATTATGATCGTCAAATG 705
            |||
Sbjct 652    GGAGAAGAATGGGGATTGTCTACAAGCACT-A--TTAATAACTACTATAATCGTCAAATG 708

Query 706    AGT-TTAACTGCAGAGTATTCTGATCACAGTGTGAAA-TGGTAT-AACACTGGTTTAG-A 761
            |||
Sbjct 709    AAACCTA-CTGCAGAATATTCTGACCACTGTGT-AAAGTGGTATGAA-ACTGGTTTAGCA 765

Query 762    TCAATTAAGGATCGAATGCTAGACAATGGGTTG-CATATAACCGTTCCGTAGAGAGA 820
            |||
Sbjct 766    A-AATTAAGGCTCGAGCGCTAAACAATGGATTGAC-TATAACCAATTCGTAGAGAAA 823

```

Figura 16. Resultado da análise de similaridade do fragmento do gene *cry8* (1420 pb) por meio da ferramenta Blastn utilizando o banco de dados GenBank.

Query	821	TGACACTGACGGTGTTAGATGTTGTGGCATTATTTTCAAGCTATGATACGCGTACGTATC	880
Sbjct	824	TGACATTGACGGTGTTAGACGTTGTTGCATTATTTTCAAACCTATGATACGCGTACGTATC	883
Query	881	CGA-TCGAAACGACAGCTCAACTTACAAGAGAAGTATATATGGATCCACTCGGTGCAGTA	939
Sbjct	884	C-ACTGGCAACAACAGCTCAGCTTACAAGGGAAGTATATACAGATCCACTTGGCGCGGTA	942
Query	940	GATGTGTCTAATATTGGATCCTGGTATGACAAAGCGCCTTCTTTTTCGGCTATAGAAAAGT	999
Sbjct	943	GATGTGCCTAATATTGGCTCCTGGTATGACAAAGCACCTTCTTTCTCAGAAATAGAAAAA	1002
Query	1000	GCGGCTATTTCGACCACCTCATTTGTTTGATTTTATAACGGGGCTTATAGTTTATACACAA	1059
Sbjct	1003	GCGGCTATTTCGTCCACCTCATGTGTTTGATTATATAACGGGACTCACAGTTTATACAAAA	1062
Query	1060	TTACGTAATCT-CACTTCTGATCGTTATAT-ACGTTTTTGGGCTGGTCATACAA-TAGGA	1116
Sbjct	1063	AAACGTAG-CTTCACTTCTGATCGTTATATGA-GATATTGGGCTGGTCAT-CAAATAAGC	1119
Query	1117	TATAAAAA-AGTCAATAC-ACCT-GAACTAATGTACAGATGTATGGAACCTAATCAAAAT	1173
Sbjct	1120	TATAAGCATA-TCGGTACGAG-TAGTACCTT-TACACAGATGTATGGAACCAATCAAAAT	1176
Query	1174	TTACAA-GATACTAGCACTTTTGATTTTAAGGGTTACAATATTTACAAGACTCTATCAAA	1232
Sbjct	1177	TTACAAAG-TACTAGCAATTTTGATTTTACGAATTACGATATTTACAAGACTTTATCAAA	1235
Query	1233	-GGATGCAGTACTCTTTGATATA-TCTCAATCTGGTTATACGTATACATTTTTTGGAAATG	1290
Sbjct	1236	TGG-TGCAGTACTCCTTGATATAGTTT-ACCCTGGTTATACGTATACATTTTTTGGAAATG	1293
Query	1291	CCGGAAGTCGAATTTTTTCTGGTAAACCAAGTGAATAATACTAGTAAG---TTAGTGTAT	1347
Sbjct	1294	CCAGAAACCGAGTTTTTATGGTAAATCAATTGAATAATACCAGAAAGACGTTAACGTAT	1353
Query	1348	AAGCCGGTTTCCAAAGATATTATACAGAAAAACAAGAGATTGAGAACTAGAATTGCCTCCA	1407
Sbjct	1354	AAACCAGCTTCCAAAGATATTATAGATCGGACAAGAGATTGGAATTAGAATTGCCTCCA	1413
Query	1408	GCAACATCAG	1417
Sbjct	1414	GAAACTTCAG	1423

Figura 16. Resultado da análise de similaridade (continuação).

Outra combinação de iniciadores foi estabelecida com os oligos Gral-cry8 (d) (BRAVO et al., 1998) e Cry8-C3 (r) para uma nova amplificação (Figura 17), a qual resultou na produção de um fragmento de aproximadamente 3302 pb (Figura 18). O produto de amplificação aborda o gene *cry8* de BT_I622 quase em sua totalidade e foi designado como “contig 3”.

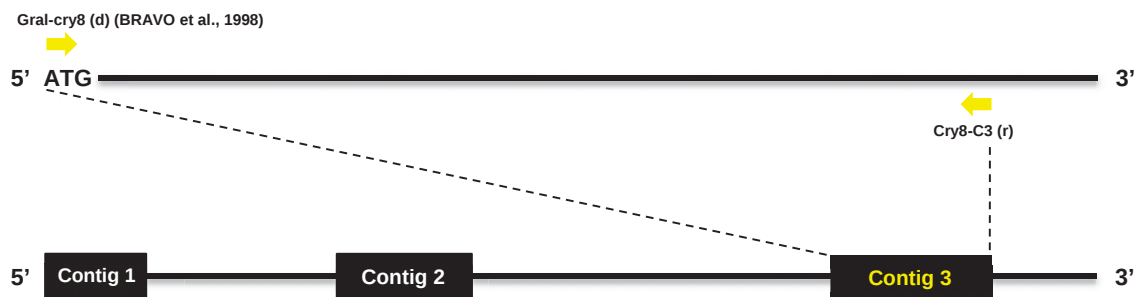


Figura 17. Esquema ilustrando a utilização dos iniciadores Gral-cry8 (d) (Bravo et al., 1998) e Cry8-C3 (r) na estratégia de “primer walking”.

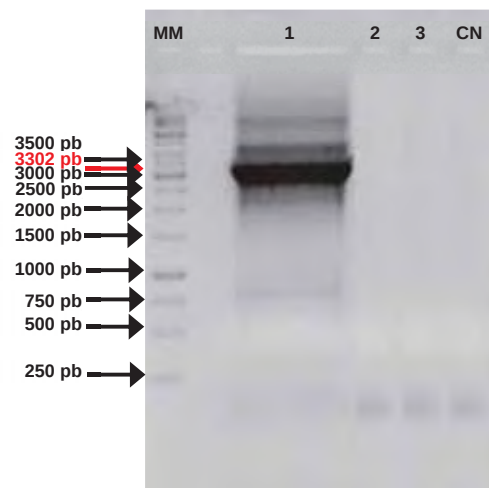


Figura 18. Eletroforograma evidenciando o produto de amplificação obtido por PCR com a utilização dos iniciadores Gral-cry8 (d) (BRAVO et al., 1998) e Cry8-C3 (r). Canaleta 1: BT_I622; 2: *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*; 3: *B. thuringiensis* var. *israelensis*; CN: controle negativo da reação. MM - marcador molecular “GeneRuler™ 1kb DNA ladder” (Fermentas Life Sciences).

O produto de PCR purificado foi clonado em vetor pGEM®-T Easy (Promega, Madison, WI, USA) e transformado em células de *E. coli*. Posteriormente, foi realizada a seleção dos clones portadores do fragmento de 3302 pb, a qual evidenciou a presença do produto de amplificação em todos os 16 clones analisados (Figura 19).

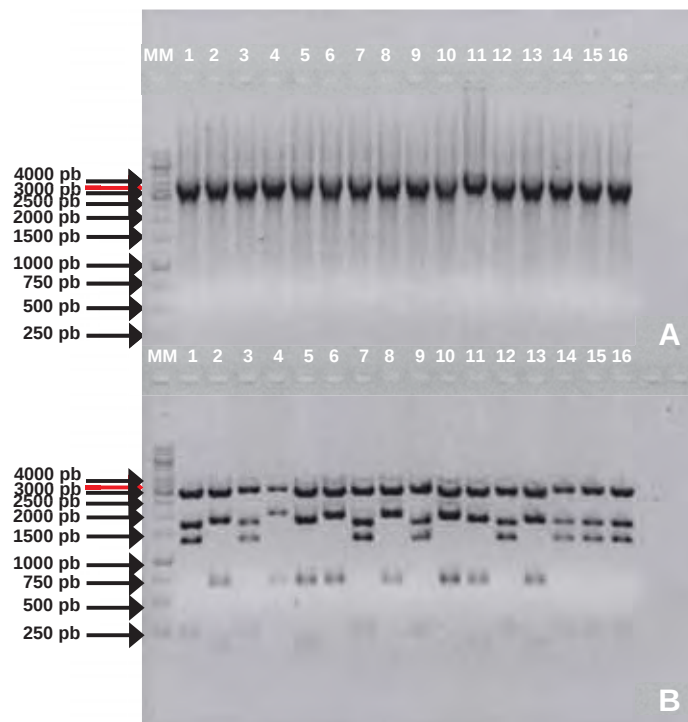


Figura 19. Análise dos clones recombinantes pelas técnicas de PCR (A) e pela restrição enzimática (B). Canaletas 1-16: clones resultantes do processo de transformação com o fragmento gênico de 3302 pb. MM - marcador molecular “GeneRuler™ 1kb DNA ladder” (Fermentas Life Sciences).

Os produtos foram sequenciados, analisados pelos programas Phred, Phrap e Consed (EWING et al., 1998; EWING & GREEN, 1998; GORDON et al., 1998) e alinhados pelo programa Kalign (LASSMANN & SONNHAMMER, 2005). A análise de similaridade realizada pela ferramenta BLAST (ALTSCHUL et al., 1997) apresentou 98% de identidade do fragmento de 3302 pb com o gene *cry8Ka2* presente no plasmídeo da linhagem *B. thuringiensis* serovar *kenyae* (FJ770570.1), ou seja, das 1345 bases comparadas, 1321 mostraram similaridade com uma determinada região do gene *cry8Ka2* (Figura 20).

 gb FJ770570.1 <i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>kenyae</i> plasmid Cry8Ka2 delta-endotoxin gene, complete cds Length=3522					
Score = 2351 bits (1273), Expect = 0.0 Identities = 1321/1345 (98%), Gaps = 0/1345 (0%) Strand=Plus/Plus					
Query	1958	TCGAATTCATCCCAGTAGATGAGACCTATGAAGCGGAACAAGATCTTGAAAAATGCAAAGA			2017
Sbjct	1949	TCGAATTCATCCCAGTAGATGAGACCTATGAAGCGGAACAAGATCTTGAAAAATGCAAAGA			2008
Query	2018	AAGCAGTGAATGCTTTGTTTACGAATACAAAAGATGGATTACGACCAGGCGTAACGGATT			2077
Sbjct	2009	AAGCAGTGAATGCTTTGTTTACGAATACAAAAGATGGATTACGACCAGGCGTAACGGATT			2068
Query	2078	ATGAAGTAAATCAAGCGGCAAACTTAGTCGAATGCCTATCAGATGATTTGTATCCAAATG			2137
Sbjct	2069	ATGAAGTAAATCAAGCGGCAAACTTAGTCGAATGCCTATCAGATGATTTGTATCCAAATG			2128
Query	2138	AAAAACGCTTGTTATTTGATGCAGTCAGAGAGGCAAAACGACTTAGCGAGGCACGGAACC			2197
Sbjct	2129	AAAAACGCTTGTTATTTGATGCAGTCAGAGAGGCAAAACGACTTAGCGAGGCACGGAACC			2188
Query	2198	TGCTTCAAGATCCAGATTTCCAAGAGATAAATGGAGAAAAATGGATGGACTGCAAGTACAG			2257
Sbjct	2189	TGCTTCAAGATCCAGATTTCCAAGAGATAAATGGAGAAAAATGGATGGACTGCAAGTACAG			2248
Query	2258	GAATTGAGGTTGTAGAAGGGGACGCTTTATTTAAAGGGCGTTATCTACGCCTACCGGGTG			2317
Sbjct	2249	GAATTGAGGTTGTAGAAGGGGACGCTTTATTTAAAGGGCGTTATCTACGCCTACCAAGTG			2308
Query	2318	CACGACAAATTGATACGGAACGTATCCAACGTATTTGTATCAAAAAATTGACGAAGGTG			2377
Sbjct	2309	CACGACAAATTGATACGGAACGTATCCAACGTATTTGTATCAAAAAATTGACGAAGGTG			2368
Query	2378	TATTAAGCCATACACAAGATATAGACTGCGAGGCTTTGTGCGAAGAAGTCAAGGGTTAG			2437
Sbjct	2369	TATTAAGCCATACACAAGATATAGACTGCGAGGCTTTGTGCGAAGAAGTCAAGGGTTAG			2428
Query	2438	AAATTTATACGATTCGTCACCAACGAATCGGATTGTAAAAATGTACCGGATAATTTAC			2497
Sbjct	2429	AAATTTATACGATTCGTCACCAACGAATCGGATTGTAAAAATGTACCGGATAATTTAC			2488
Query	2498	TGCCAGATGCATCTCCCGAAATGCTGGTGATGGAATCAATCGATGCAGCGAACAAAAGT			2557
Sbjct	2489	TGCCAGATGCATCTCCTGGAAATGCTGGTGATGGAATCAATCGATGCAGCGAACAAAAGT			2548
Query	2558	ATGTAAATAGTCGTTTAGAAGGAGAAAAAGGCTTACCAAATGGCAGTCGTTCTGCTGAAG			2617
Sbjct	2549	ATGTAAATAGTCGCTAGAAGGAGAAAAAGGCTTACCAAATGGCAGTCGTTCTGCTGAAG			2608
Query	2618	CGCATGAATTCTCTCTTCTATTGATATAGGAGAAATCGATTACAATGAAAATGCAGGAG			2677
Sbjct	2609	CGCATGAGTTCTCAATCCCTATCGATACAGGTGAAATCGATTACAATGAAAATGCAGGAA			2668
Query	2678	TATGGGTTGGCTTTAAGATTACGGATCCAGAAGGATATGCAACACTTGGAATCTTGAAT			2737
Sbjct	2669	TATGGGTTGGATTTAAGATTACGGACCCAGAGGGATATGCAACACTTGGAATCTTGAAT			2728
Query	2738	TGGTAGAAGAGGGTCCATTATTAGGAGACACATTAGAACGCGTGAAAAGGGAAGAACAAC			2797
Sbjct	2729	TGGTCGAAGAGGGACCTTTGTCTAGGAGACGCATTAGAACGCTTGCAAGAGAAGAACAAC			2788

Figura 20. Resultado da análise de similaridade do fragmento do gene *cry8* (3302 pb) por meio da ferramenta Blastn utilizando o banco de dados GenBank.

Query	2798	AATGGAAGATTCAAATGACAAAAAGACGAGAAGAAACAGATAGAAAATATATGATAGCCA	2857
Sbjct	2789	AATGGAAGATTCAAATGACAAAAAGACGAGAAGAAACAGATAGAAAATATATGATAGCCA	2848
Query	2858	AACAGGCGGTAGACCGTTTATATGCTGATTATCAAGATCAGCAATTAATCCAAATGTAG	2917
Sbjct	2849	AACAGGCGGTAGACCGTTTATATGCTGATTATCAAGATCAGCAATTAATCCAAATGTAG	2908
Query	2918	AGATTACAGATATTACTGCGGCTCAAAACGTGATACAGTCCATTCTTATGTATATAATG	2977
Sbjct	2909	AGATTACAGATATTACTGCGGCTCAAAACGTGATACAGTCCATTCTTATGTATATAATG	2968
Query	2978	ATGCGTTCCCAGGGTTACCAGGAATGAACATACGAAGTTTACAGAGCTAACAGATCGAC	3037
Sbjct	2969	ATGCGTTCCCAGGGTTACCAGGAATGAACATACGAAGTTTACAGAGCTAACAGATCGAC	3028
Query	3038	TCCAACAAGCATGGAGTTTGTATGATCAACGAAATGCCATACCAAATGGAGATTTCGAA	3097
Sbjct	3029	TCCAACAAGCATGGAGTTTGTATGATCAACGAAATGCCATACCAAATGGAGATTTCGAA	3088
Query	3098	ATGAATTAAGTAATTGGAACACAACAGCTGGTGTCAATGTACAACAACCTCAATGGTACAT	3157
Sbjct	3089	ATGAATTAAGTAATTGGAACACAACAGCTGGTGTCAATGTACAACAACCTCAATGGTACAT	3148
Query	3158	CTGTCCTTGTGATTCCAAATTGGGATGCACAAGTTTCTCAACAGTTTACAGTCCAACCGA	3217
Sbjct	3149	CTGTCCTTGTGATTCCAAATTGGGATGCACAAGTTTCTCAACAGTTTACAGTCCAACCGA	3208
Query	3218	ACCAAAGATATGTGCTACGAGTTACCGCAAGAAAAGAAGGTGTAGGAAATGGATATGTAA	3277
Sbjct	3209	ACCAAAGATATGTGCTACGAGTTACCGCAAGAAAAGAAGGTGTAGGAAATGGATATGTAA	3268
Query	3278	GTATCCGTGATGGTGGAAATCAAAC	3302
Sbjct	3269	GTATCCGTGATGGTGGCAATCAAAC	3293

Figura 20. Resultado da análise de similaridade (cont.).

A análise dos fragmentos gerados por PCR com as diferentes combinações de oligonucleotídeos (Gral-cry8 [d], Gral-cry3 [r] e Cry8-C3 [d]), resultou na formação de três “contigs”. No entanto, devido à capacidade de leitura das bases pelo sequenciador, observou-se a existência de lacunas (“gaps”) entre os “contigs” já sequenciados, sendo necessária a elaboração de novos iniciadores específicos para posterior obtenção da ORF completa do gene *cry8* do isolado BT_I622.

Dessa forma, o fechamento do “gap” existente entre os “contigs 1 e 2” foi obtido por meio da utilização do par de oligonucleotídeos Cry8-C4 (d) / Cry8-C4 (r), dando origem ao “contig 4” (Figura 21).



Figura 21. Esquema ilustrando a utilização dos iniciadores Cry8-C4 (d) e Cry8-C4 (r) na estratégia de “primer walking”.

Paralelamente, foram utilizados os iniciadores Cry8-C5 (d) / Cry8-C5 (r) na tentativa de preencher o “gap” entre os “contigs 2 e 3”. Os resultados obtidos indicaram a formação de dois “contigs” (5.1 e 5.2) (Figura 22), os quais possibilitaram o fechamento parcial do “gap” citado acima.

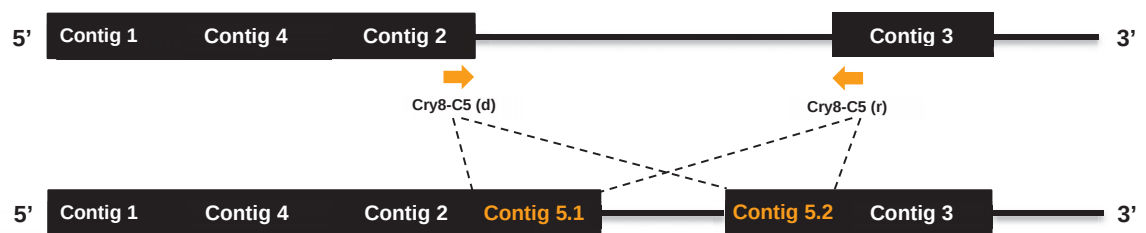


Figura 22. Esquema ilustrando a utilização dos iniciadores Cry8-C5 (d) e Cry8-C5 (r) na estratégia de “primer walking”.

Um terceiro par de oligonucleotídeos foi introduzido na análise (Cry8-C6 [d] / Cry8-C6 [r]), sendo este responsável pela obtenção da porção final do gene *cry8* de BT_I622. A sequência amplificada é portadora do códon de terminação da tradução gênica (“stop códon”), representado pela sequência TAA, e foi nomeada “contig 6” (Figura 23).

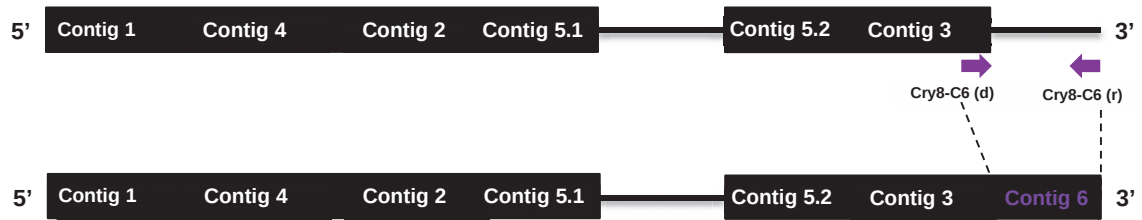


Figura 23. Esquema ilustrando a utilização dos iniciadores Cry8-C6 (d) e Cry8-C6 (r) na estratégia de “primer walking”.

As reações de amplificação com os distintos pares de oligonucleotídeos (Cry8-C4 [d / r], Cry8-C5 [d / r] e Cry8-C6 [d / r]) resultaram em produtos em torno de 628, 1580 e 508 pb, respectivamente (Figura 24).

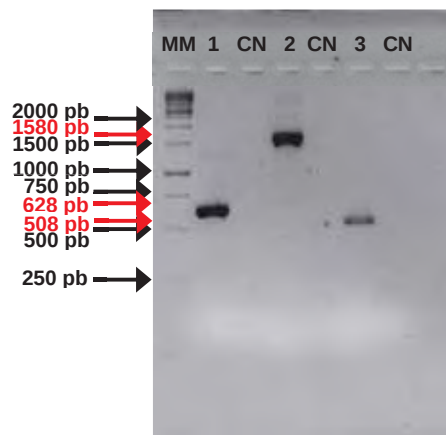


Figura 24. Eletróforograma evidenciando os produtos de amplificação obtidos a partir do isolado BT_I622 com diferentes oligonucleotídeos iniciadores. Canaleta 1: Cry8-C4 (d / r); 2: Cry8-C5 (d / r); 3: Cry8-C6 (d / r); CN: controle negativo da reação. MM - marcador molecular “GeneRuler™ 1kb DNA ladder” (Fermentas Life Sciences).

Os clones obtidos no processo de transformação com os produtos de amplificação (628, 1580 e 508 pb) foram analisados por PCR e restrição enzimática, confirmando a presença do inserto de interesse em todos eles (Figuras 25, 26 e 27).

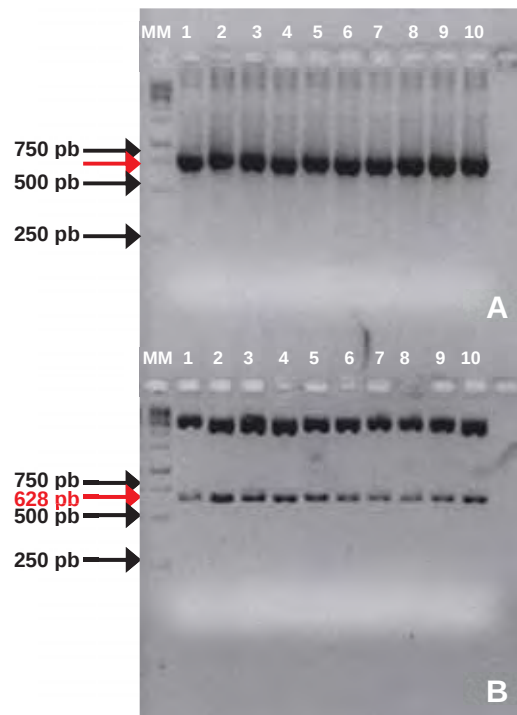


Figura 25. Análise dos clones recombinantes pelas técnicas de PCR (A) e pela restrição enzimática (B). Canaleta 1-10: clones resultantes do processo de transformação com o fragmento gênico de 628 pb. MM - marcador molecular “GeneRuler™ 1kb DNA ladder” (Fermentas Life Sciences).

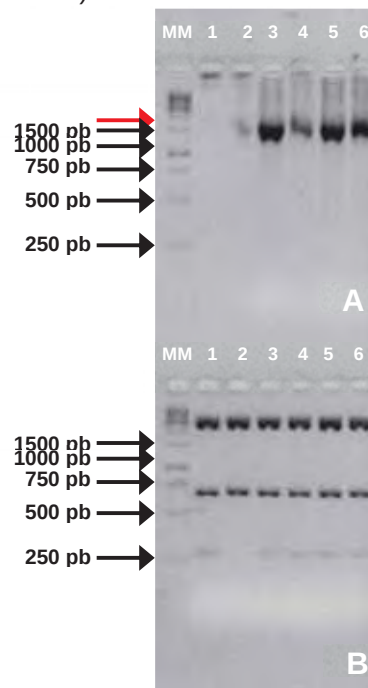


Figura 26. Análise dos clones recombinantes pelas técnicas de PCR (A) e pela restrição enzimática (B). Canaletas 1-6: clones resultantes do processo de transformação com o fragmento gênico de 1580 pb. MM - marcador molecular “GeneRuler™ 1kb DNA ladder” (Fermenta Life Sciences).

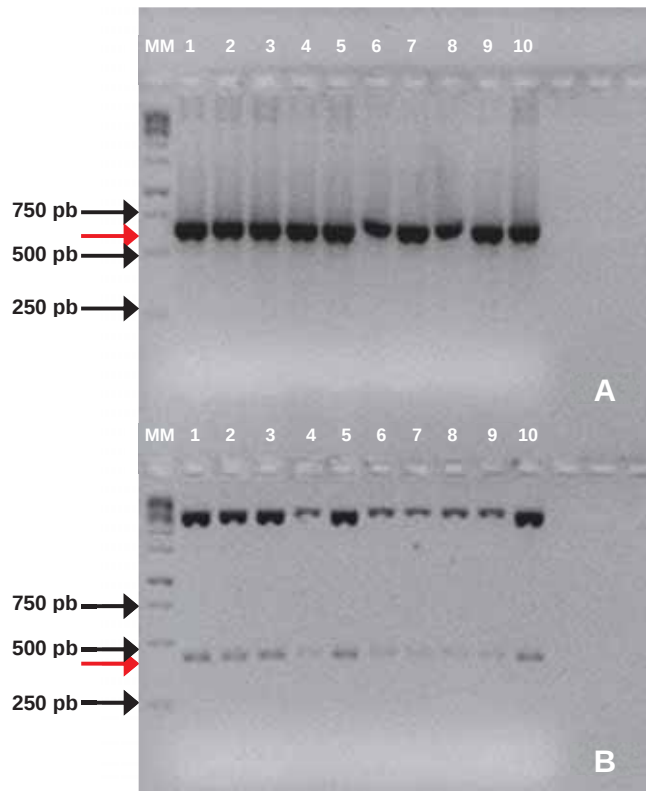


Figura 27. Análise dos clones recombinantes pelas técnicas de PCR (A) e pela restrição enzimática (B). Canaleta 1-10: clones resultantes do processo de transformação com o fragmento gênico de 508 pb. MM - marcador molecular "GeneRuler™ 1kb DNA ladder" (Fermentas Life Sciences).

Os produtos gerados com os três pares de iniciadores específicos foram sequenciados e analisados pelos programas Phred, Phrap e Consed (EWING et al., 1998; EWING & GREEN, 1998; GORDON et al., 1998). De acordo com a análise realizada pela ferramenta BLAST (NCBI), o fragmento de 628 pb amplificado com os oligonucleotídeos Cry8-C4 (d / r) apresentou uma identidade de 86% com o gene *cry8Ja1* de *B. thuringiensis* FPT-2 (EU625348.1) (Figura 28).

```

> gb|EU625348.1| Bacillus thuringiensis strain FPT-2 delta-endotoxin gene, complete
cds
Length=3489

Score = 597 bits (323), Expect = 3e-170
Identities = 488/566 (86%), Gaps = 18/566 (3%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 GCAGAATACGCAAGGAATAAGGCAATTGCAGAATTAGAGGGGTTAGGGAATAACTA-CAA 59
      |||
Sbjct 379 GCAGAATACGCAAGGGCTAAGGCACCTTGCAAGAATTAGAAGGGTTAGGAAATAACTATC-A 437

Query 60 AATATATTTAACAGCACTTGAAGAATGGCAGAAAAATCCAAGTAGTACAAGAGTCTTACG 119
      |||
Sbjct 438 ATTATATTTAACAGCACTTGAAGAATGGCAGGAAAAATCCAAGCAGTACAAGAGTCTTACG 497

Query 120 CGATGTTTCAAGATCGATTTGAAATCTTGATAGTTTATTTACGCAATATATGCCTTCTTT 179
      |||
Sbjct 498 TGATGTTTCAAGATCGATTTGAAATCTTGATAGCTTATTTACACAATATATGCCTTCTTT 557

Query 180 TCGGGTAGCTGGTTATGAAGTACCATTACTTACAGTATATGCGCAAGCAGCTAACCTTCA 239
      |||
Sbjct 558 TCGGGTAACAGGTTATGAAGTACCATTACTTTCAGTATATGCGCAAGCAGCTAACCTTCA 617

Query 240 TTTACTGTTATTAAGGATGCTTCAAATTTTGGAGAAGAATGGGGATTAAC-AGGAAGTG 298
      |||
Sbjct 618 TTTATTGTTATTAAGGACGCTTCTATTTTGGAGAAGAATGGGGGTTCTCTAC-AACCG 676

Query 299 A-AGTTAATACCTATTATGATCGTCAAATGAGT-TTAACT-GCAGAGTATTCTGATCACA 355
      |||
Sbjct 677 CTA-TTAATAACTATTATAATCGTCAAATGAGTCTTATCGCGCA-A-TATTCTGATCATT 733

Query 356 GTGTGA-AATGGTATA-ACACTGGTTTAGATCAATTAAGGATCGAATGCTAGACAATG 413
      |||
Sbjct 734 GTGT-ACAATGGTATAGA-ACTGGTTTAGATCGATTAAAGGATCGAATGCTAAACAATG 791

Query 414 GGTGTCATATAACCGTTTCCGTAGAGAGATGACACTGA-CGGTGTAGATGTTGTGGCAT 472
      |||
Sbjct 792 GGTGTAATATAACCGTTTCCGAAGAGAAATGACATT-ATCGGTGTAGATATTATGACAT 850

Query 473 TATTTTCAA-GCTATGATACGCGTACGTATCCGATCGAAACGACAGCTCAACTTACAAGA 531
      |||
Sbjct 851 TATTTCCAATG-TATGACATGCGCACGTACCCAATGGAACAAAAGCACAACTAACAAGG 909

Query 532 GAAGTATATATGGATCCACTCGGTGC 557
      |||
Sbjct 910 GAAGTATATACAGATCCAATTGGTGC 935

```

Figura 28. Resultado da análise de similaridade do fragmento do gene *cry8* (628 pb) por meio da ferramenta Blastn utilizando o banco de dados GenBank.

As análises de alinhamento feitas com os fragmentos de 1580 e 508 pb, resultantes da amplificação com os iniciadores Cry8-C5 (d / r) e Cry8-C6 (d / r), indicaram similaridade de 98 e 99%, respectivamente, com o gene *cry8Ka2* presente no plasmídeo da linhagem *B. thuringiensis* serovar *kenyae* (FJ770570.1) (Figuras 29 e 30).

```

> gb|FJ770570.1 Bacillus thuringiensis serovar kenyae plasmid Cry8Ka2 delta-
endotoxin gene, complete cds
Length=3522

Score = 1587 bits (859), Expect = 0.0
Identities = 905/928 (98%), Gaps = 0/928 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 653 TCGAATTCATCCCAGTAGATGAGACCTATGAAGCGGAACAAGATCTTGAAAATGCAAAGA 712
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1949 TCGAATTCATCCCAGTAGATGAGACCTATGAAGCGGAACAAGATCTTGAAAATGCAAAGA 2008

Query 713 AAGCAGTGAATGCTTTGTTTACGAATACAAAAGATGGATTACGACCAGGCGTAACGGATT 772
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 2009 AAGCAGTGAATGCTTTGTTTACGAATACAAAAGATGGATTACGACCAGGCGTAACGGATT 2068

Query 773 ATGAAGTAAATCAAGCGGCAAACCTTAGTCGAATGCCTATCAGATGATTTGTATCCAAATG 832
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 2069 ATGAAGTAAATCAAGCGGCAAACCTTAGTCGAATGCCTATCAGATGATTTGTATCCAAATG 2128

Query 833 AAAAACGCTTGTTATTTGATGCAGTCAGAGAGGCAAAACGACTTAGCGAGGCACGGAACC 892
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 2129 AAAAACGCTTGTTATTTGATGCAGTCAGAGAGGCAAAACGACTTAGCGAGGCACGGAACC 2188

Query 893 TGCTTCAAGATCCAGATTTCCAAGAGATAAATGGAGAAAATGGATGGACTGCAAGTACAG 952
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 2189 TGCTTCAAGATCCAGATTTCCAAGAGATAAATGGAGAAAATGGATGGACTGCAAGTACAG 2248

Query 953 GAATTGAGGTTGTAGAAGGGGACGCTTTATTTAAAGGGCGTTATCTACGCCTACCGGGTG 1012
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 2249 GAATTGAGGTTGTAGAAGGGGACGCTTTATTTAAAGGGCGTTATCTACGCCTACCGGGTG 2308

Query 1013 CACGACAAATTGATACGGAACGATCCAACGTATTTGTATCAAAAAATTGACGAAGGTG 1072
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 2309 CACGACAAATTGATACGGAACGATCCAACGTATTTGTATCAAAAAATTGACGAAGGTG 2368

Query 1073 TATTAAGCCATACACAAGATATAGACTGCGAGGCTTTGTGCGAAGAAGTCAAGGGTTAG 1132
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 2369 TATTAAGCCATACACAAGATATAGACTGCGAGGCTTTGTGCGAAGAAGTCAAGGGTTAG 2428

Query 1133 AAATTTATACGATTTCGTACCAAACGAATCGGATTGTAAAAAATGTACCGGATAATTTAC 1192
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 2429 AAATTTATACGATTTCGTACCAAACGAATCGGATTGTAAAAAATGTACCGGATAATTTAC 2488

Query 1193 TGCCAGATGCATCTCCCGGAAATGCTGGTGATGGAATCAATCGATGCAGCGAACAAAAGT 1252
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 2489 TGCCAGATGCATCTCCCGGAAATGCTGGTGATGGAATCAATCGATGCAGCGAACAAAAGT 2548

Query 1253 ATGTAAATAGTCGTTTAGAAGGAGAAAAAGGCTTACCAAATGGCAGTCGTTCTGCTGAAG 1312
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 2549 ATGTAAATAGTCGTTTAGAAGGAGAAAAAGGCTTACCAAATGGCAGTCGTTCTGCTGAAG 2608

Query 1313 CGCATGAATTCTCTCTTCTATTGATATAGGAGAAATCGATTACAATGAAAATGCAGGAG 1372
      |||||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 2609 CGCATGAGTTCTCAATCCCTATCGATACAGGTGAAATCGATTACAATGAAAATGCAGGAA 2668

Query 1373 TATGGGTTGGCTTTAAGATTACGGATCCAGAAGGATATGCAACACTTGGAAATCTTGAAT 1432
      |||||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 2669 TATGGGTTGGATTTAAGATTACGGACCCAGAGGGATATGCAACACTTGGAAATCTTGAAT 2728

```

Figura 29. Resultado da análise de similaridade do fragmento do gene *cry8* (1580 pb) por meio da ferramenta Blastn utilizando o banco de dados GenBank.

Query	1433	TGGTAGAAGAGGGTCCATTATTAGGAGACACATTAGAACGCGTGAAAAGGGAAGAACAAC	1492
Sbjct	2729	TGGTCGAAGAGGGACCTTTGTCAGGAGACGCATTAGAACGCTTGCAAAGAGAAGAACAAC	2788
Query	1493	AATGGAAGATTCAAATGACAAAAAGACGAGAAGAAACAGATAGAAAATATATGATAGCCA	1552
Sbjct	2789	AATGGAAGATTCAAATGACAAAAAGACGAGAAGAAACAGATAGAAAATATATGATAGCCA	2848
Query	1553	AACAGGCGGTAGACCGTTTATATGCTGA	1580
Sbjct	2849	AACAGGCGGTAGACCGTTTATATGCTGA	2876

Figura 29. Resultado da análise de similaridade (cont.).

 gb FJ770570.1 Bacillus thuringiensis serovar kenya plasmid Cry8Ka2 delta-endotoxin gene, complete cds Length=3522				
Score = 928 bits (502), Expect = 0.0 Identities = 506/508 (99%), Gaps = 0/508 (0%) Strand=Plus/Plus				
Query	1	GCTAACAGATCGACTCCAACAAGCATGGAGTTTGTATGATCAACGAAATGCCATACCAAA	60	
Sbjct	3015	GCTAACAGATCGACTCCAACAAGCATGGAGTTTGTATGATCAACGAAATGCCATACCAAA	3074	
Query	61	TGGAGATTTCGAAATGAATTAAGTAATTGGAACACAACAGCTGGTGTCAATGTACAACA	120	
Sbjct	3075	TGGAGATTTCGAAATGAATTAAGTAATTGGAACACAACAGCTGGTGTCAATGTACAACA	3134	
Query	121	ACTCAATGGTACATCTGTCCTTGTGATTCCAAATTGGGATGCACAAGTTTCTCAACAGTT	180	
Sbjct	3135	ACTCAATGGTACATCTGTCCTTGTGATTCCAAATTGGGATGCACAAGTTTCTCAACAGTT	3194	
Query	181	TACAGTCCAACCGAACCAGATATGTGCTACGAGTTACCGCAAGAAAAGAAGGTGTAGG	240	
Sbjct	3195	TACAGTCCAACCGAACCAGATATGTGCTACGAGTTACCGCAAGAAAAGAAGGTGTAGG	3254	
Query	241	AAATGGATATGTAAGTATCCGTGATGGTGGAAATCAAACAGAAACGCTTACGTTTAGTGC	300	
Sbjct	3255	AAATGGATATGTAAGTATCCGTGATGGTGGCAATCAAACAGAAACGCTTACGTTTAGTGC	3314	
Query	301	AAGTGATTATGATACAAATGGTGTGTATAATATACAAGCGTCGAATACAAACGGATATAA	360	
Sbjct	3315	AAGTGATTATGATACAAATGGTGTGTATAATATACAAGCGTCGAATACAAACGGATATAA	3374	
Query	361	CACAAATGGTGTGTACAATGATCAAACCGGCTATATCACAAAAACAGCGGAATTCATTCC	420	
Sbjct	3375	CACAAATGGTGTGTACAATGATCAAACCGGCTATATCACAAAAACAGCGGAATTCATTCC	3434	
Query	421	ACATACAAATCAAGTGTGGATTGAGATGAGTGAGACCGAAGGTACGTTCTATATCGAAAG	480	
Sbjct	3435	ACATACAAATCAAGTGTGGATTGAGATGAGTGAGACCGAAGGTACGTTCTATATCGAAAG	3494	
Query	481	TGTAGAATTGATTGTGACGTAGAGTAA	508	
Sbjct	3495	TGTAGAATTGATTGTGACGTAGAGTAA	3522	

Figura 30. Resultado da análise de similaridade do fragmento do gene *cry8* (508 pb) por meio da ferramenta Blastn utilizando o banco de dados GenBank.

A elaboração de iniciadores internos, tendo como meta o fechamento das lacunas existentes entre os “contigs” foi satisfatória, visto que grande parte do gene teve sua sequência elucidada. Porém, a obtenção da sequência completa do gene *cry8* de BT_I622 só foi possível devido à elaboração de outro par de oligonucleotídeos (Cry8-C7 [d e r]) visando fechar o “gap” localizado entre os “contigs 5.1 e 5.2” (Figura 31).

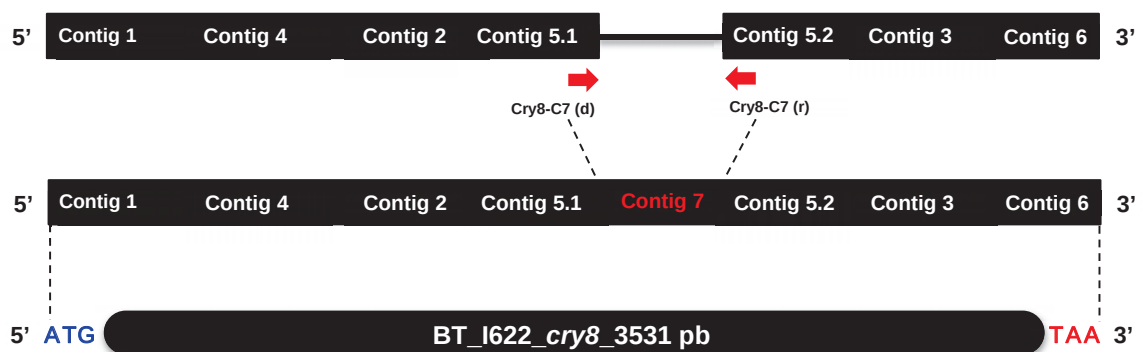


Figura 31. Esquema ilustrando a utilização dos iniciadores Cry8-C7 (d) e Cry8-C7 (r) e a obtenção da sequência completa do novo gene *cry8* pela estratégia de “primer walking”. Em destaque: os códons de iniciação (ATG) em azul e finalização do gene (TAA) em vermelho.

Resultante do processo de amplificação com os iniciadores supracitados, obteve-se um fragmento de aproximadamente 510 pb (“contig 7”), o qual foi decisivo para a finalização da sequência do gene *cry8* de BT_I622 (Figura 32).

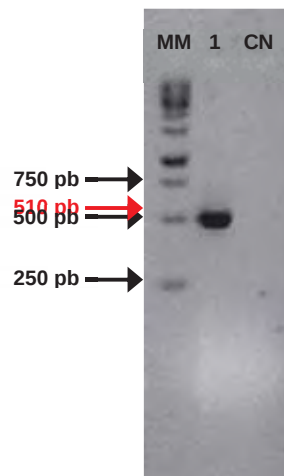


Figura 32. Eletroforograma evidenciando o produto de amplificação obtido por PCR com a utilização dos oligonucleotídeos Cry8-C7 (d) e Cry8-C7 (r). Canaleta 1: BT_I622; CN: controle negativo da reação. MM - marcador molecular “GeneRuler™ 1kb DNA ladder” (Fermentas Life Sciences).

O fragmento de ~ 510 pb foi armazenado no vetor de clonagem pGEM®-T Easy (Promega, Madison, WI, USA), transformado em *E. coli*, sendo que após a confirmação dos clones recombinantes (Figura 33), realizou-se o sequenciamento deste material. Os dados foram submetidos à análise de alinhamento pelo algoritmo BLASTn, resultando em um fragmento 100% idêntico a sequência presente no gene *cry8Ka2* de *B. thuringiensis* serovar *kenyae* (FJ770570.1) (Figura 34).

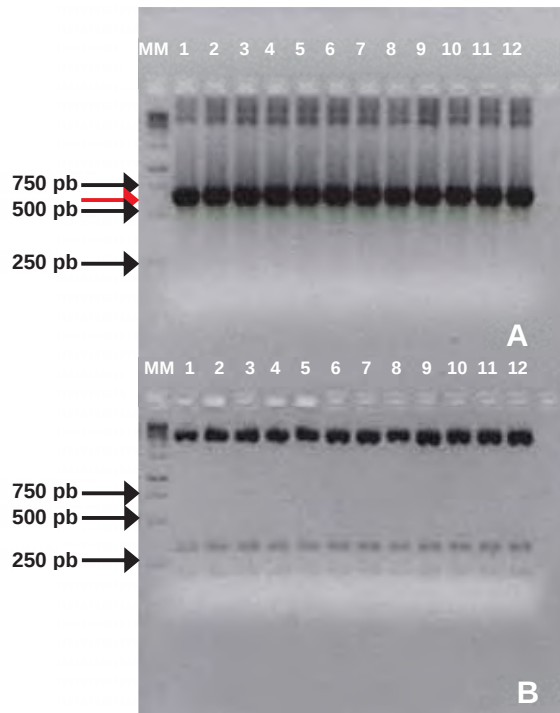


Figura 33. Análise dos clones recombinantes pelas técnicas de PCR (A) e pela restrição enzimática (B). Canaleta 1-12: clones resultantes do processo de transformação com o fragmento gênico de 510 pb. MM - marcador molecular “GeneRuler™ 1kb DNA ladder” (Fermentas Life Sciences).

> gb FJ770570.1 Bacillus thuringiensis serovar kenya plasmid Cry8Ka2 delta-endotoxin gene, complete cds Length=3522 Score = 590 bits (319), Expect = 3e-168 Identities = 319/319 (100%), Gaps = 0/319 (0%) Strand=Plus/Plus					
Query	192	TCGAATTCATCCAGTAGATGAGACCTATGAAGCGGAACAAGATCTTGAAAATGCAAAGA	251		
Sbjct	1949	TCGAATTCATCCAGTAGATGAGACCTATGAAGCGGAACAAGATCTTGAAAATGCAAAGA	2008		
Query	252	AAGCAGTGAATGCTTTGTTTACGAATACAAAAGATGGATTACGACCAGGCGTAACGGATT	311		
Sbjct	2009	AAGCAGTGAATGCTTTGTTTACGAATACAAAAGATGGATTACGACCAGGCGTAACGGATT	2068		
Query	312	ATGAAGTAAATCAAGCGGCAAACTTAGTCGAATGCCTATCAGATGATTTGTATCCAAATG	371		
Sbjct	2069	ATGAAGTAAATCAAGCGGCAAACTTAGTCGAATGCCTATCAGATGATTTGTATCCAAATG	2128		
Query	372	AAAAACGCTTGTTATTTGATGCAGTCAGAGAGGCAAAACGACTTAGCGAGGCACGGAACC	431		
Sbjct	2129	AAAAACGCTTGTTATTTGATGCAGTCAGAGAGGCAAAACGACTTAGCGAGGCACGGAACC	2188		
Query	432	TGCTTCAAGATCCAGATTTCCAAGAGATAAATGGAGAAAATGGATGGACTGCAAGTACAG	491		
Sbjct	2189	TGCTTCAAGATCCAGATTTCCAAGAGATAAATGGAGAAAATGGATGGACTGCAAGTACAG	2248		
Query	492	GAATTGAGGTTGTAGAAGG	510		
Sbjct	2249	GAATTGAGGTTGTAGAAGG	2267		

Figura 34. Resultado da análise de similaridade do fragmento do gene *cry8* (510 pb) por meio da ferramenta Blastn.

Finalizada a estratégia de “primer walking”, as sequências foram novamente analisadas pelos programas Phred/Phrap/Consed (EWING et al., 1998; EWING & GREEN, 1998; GORDON et al., 1998) resultando na obtenção de um “contig” único (sequência consenso) totalizando 3531 pb (Figuras 35 e 36).

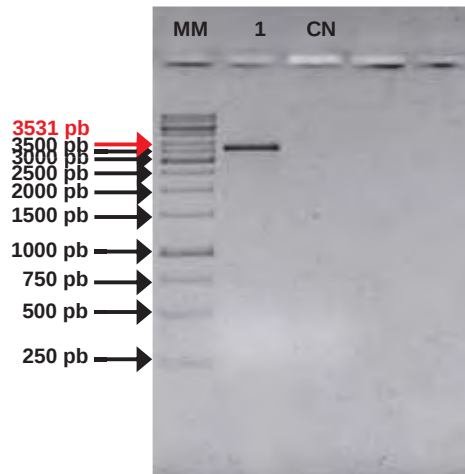


Figura 35. Eletroforograma evidenciando a amplificação do novo gene *cry8* por PCR com a utilização dos oligonucleotídeos Gral-*cry8* (d) e Cry8-C7 (r). Canaleta 1: BT_I622; CN: controle negativo da reação. MM - marcador molecular “GeneRuler™ 1kb DNA ladder” (Fermentas Life Sciences).

atgagtccaa	ataatctaaa	tgaatatgaa	attatagatg	cgacaccttc	tacatctgta	60
tctaatagata	ctaccagata	cccttttgca	aatgaaccaa	caaatgcgtt	acaaaatatg	120
aattataagg	attatttaag	aatgtctgaa	ggttacgata	gtgaatatgc	tggttcacct	180
gaagcattta	ctagtgggca	agatgcggtt	aaagccgcga	ttgggtggtt	aggtcaaata	240
ttggggaaat	taggggttcc	atttggtggg	ccgatttgta	gcctatatag	tgcacttatt	300
gatgttttgt	ggccagggtg	aaagagtcaa	tgggaaattt	ttatggaaca	agtagaagca	360
ctcattaata	aaaaaatagc	agaatacgca	aggaataagg	caattgcaga	attagagggg	420
ttagggaata	actacaaaat	atatttaaca	gcacttgaag	aatggcagaa	aaatccaagt	480
agtacaaagag	tcttacgcga	tgttcagaat	cgatttgaag	ttcttgatag	tttatattacg	540
caatatatgc	cttcttttcg	ggttagctggt	tatgaagtac	cattacttac	agtatatgcg	600
caagcagcta	accttcattt	actgttatta	aaggatgctt	caaatttttg	agaagaatgg	660
ggattaacag	gaagtgaagt	taatacctat	tatgatcgtc	aaatgagttt	aactgcagag	720
tattctgatc	acagtgtgaa	atggtataac	actggtttag	atcaattaaa	aggatcgaat	780
gctagacaat	gggttgcata	taaccgtttc	cgtagagaga	tgacactgac	ggtgttagat	840
gttgtggcat	tattttcaag	ctatgatacg	cgtacgtatc	cgatcgaaac	gacagctcaa	900
cttacaagag	aagtatatat	ggatccactc	ggtgcagtag	atgtgtctaa	tattggatcc	960
tggtatgaca	aagcgcttcc	tttttcggct	atagaaagtg	cggtctattcg	accacctcat	1020
ttggttgatt	ttataacggg	gcttatagtt	tatacacata	tacgtaattct	cacttctgat	1080
cgttatatac	gtttttgggc	tggtcatata	ataggtataa	aaaaagtcaa	tacacctgaa	1140
actaatgtac	agatgtatgg	aactaatcaa	aatttacaag	atactagcac	ttttgatttt	1200
aaggggttaca	atattttaca	gactctatca	aaggatgcag	tactctttga	tatatctcaa	1260
tctggttata	cgtatacatt	ttttggaatg	ccggaagtgc	aattttttct	ggtaaaccaa	1320
gtgaataata	ctagtaagtt	agtgtataag	ccggtttcca	aagatattat	acagaaaaca	1380
agagattcag	aactagaatt	gcctccagca	acatcagatc	caataatttc	taacgcatac	1440
agccatagat	taaatcatat	tacattttatt	tactccagtt	caaccaatac	gtatgtacct	1500
gtattttctt	gggcacattg	gagtgcagat	cttgagaata	caatttatcc	agaaaaaatt	1560
acacaaatcc	cagctgtaaa	agctaattat	accggctcct	ctacaacagt	aataaattct	1620
agaggattat	atggagggaa	tatagtacac	acatctaatg	ctaattgcgac	tgaagcaatc	1680
ttaggaaatta	attgtagatt	taattttaca	tcaaatcaga	aatacattgt	tagaattaga	1740
tatgctgctg	acagatctgg	tacgcttaaa	ttatctgctg	ggacctctag	caggactata	1800
gatttttaatg	caacgatgac	tcctgggtact	agtcttgaat	ataattcctt	taaatatgcg	1860
atgtcaaaca	cgttctttga	agttagtaca	aatcaaatat	taaaccttct	tatttttgtg	1920
acggagaatt	ttccgggtaa	cttatacatt	gataaattcg	aattcatccc	agtagatgag	1980
acctatgaag	cggaaacaaga	tcttgaaaat	gcaaagaaag	cagtgaatgc	ttgtgttacg	2040
aatacaaaag	atggattacg	accaggcgta	acggattatg	aagtaaatca	agcggcaaac	2100
ttagtcgaa	gcctatcaga	tgattttgtat	ccaaatgaaa	aacgcttggt	atttgatgca	2160
gtcagagagg	caaaacgact	tagcgaggca	cggaaacctgc	ttcaagatcc	agattttcaa	2220
gagataaatg	gagaaaatgg	atggactgca	agtacaggaa	ttgagggtgt	agaagggggac	2280
gctttattta	aagggcggtta	tctacgccta	ccgggtgcac	gacaaaattga	tacggaaacg	2340
tatccaacgt	attttgtatca	aaaaattgac	gaaggtgtat	taaagccata	cacaagatat	2400
agactgcgag	gctttgtcgg	aagaagtcaa	gggttagaaa	tttatacgat	tcgtcaccaa	2460
acgaatcggg	ttgtaaaaaa	tgtaccggat	aattttactgc	cagatgcac	tcccgaaat	2520
gctgggtgatg	gaatcaatcg	atgcagcgaa	caaaagtatg	taaatagtcg	tttagaagga	2580
gaaaaaggct	taccaaatgg	cagtcgttct	gctgaagcgc	atgaattctc	tcttcttatt	2640
gatataggag	aaatcgatta	caatgaaaat	gcaggagtat	gggttggtt	taagattacg	2700
gatccagaag	gatatgcaac	acttggaat	cttgaattgg	tagaagaggg	tccattatta	2760
ggagacacat	tagaacgcgt	gaaaagggaa	gaacaacaat	ggaagattca	aatgacaaaa	2820
agacgagaag	aaacagatag	aaaatatatg	atagccaaac	aggcggtaga	ccgtttatat	2880
gctgattatc	aagatcagca	attaaatcca	aatgtagaga	ttacagatat	tactgaggct	2940
caaaacgtga	tacagtccat	tccttatgta	tataatgatg	cgttcccagg	gttaccagga	3000
atgaactata	cgaagtttac	agagctaaca	gatcgactcc	aacaagcatg	gagtttgtat	3060
gatcaacgaa	atgccatacc	aaatggagat	ttccgaaatg	aattaagtaa	ttggaacaca	3120
acagctgggtg	tcaatgtaca	acaactcaat	ggtacatctg	tccttgatg	tccaaattgg	3180
gatgcacaag	tttctcaaca	gtttacagtc	caaccgaacc	aaagatatgt	gctacgagtt	3240
accgcaagaa	aagaagggtg	aggaaatgga	tatgtaagta	tccgtgatgg	tggaaatcaa	3300
acagaaacgc	ttacgttttag	tgcaagtgat	tatgatacaa	atggtgtgta	taatatacaa	3360
gcgtcgaaata	caaacggata	taacacaaat	ggtgtgtaca	atgatcaaac	cggctatatc	3420
acaaaaacag	cggaaattcat	tccacataca	aatcaagtgt	ggattgagat	gagtgagacc	3480
gaaggtacgt	tctatatcga	aagtgtagaa	ttgattgtag	acgtagagta	a	3531
//						

Figura 36. Sequência de nucleotídeos do novo gene *cry8* proveniente do isolado BT_I622.

A análise de alinhamento de nucleotídeos (BLASTn) demonstrou uma identidade de 98% da sequência de nucleotídeos do gene *cry8* (BT_I622) em relação gene *cry8Ka2* de *B. thuringiensis* serovar *kenyae* (FJ770570.1). Das 1574 bases consideradas na avaliação, 1549 foram similares aquelas contidas no gene *cry8Ka2*, segundo resultados gerados pelo algoritmo BLASTn. Por meio do alinhamento, foi possível detectar 25 substituições de nucleotídeos (Figura 37).

```

> gb|FJ770570.1 Bacillus thuringiensis serovar kenyae plasmid Cry8Ka2 delta-
endotoxin gene, complete cds
Length=3522

Score = 2769 bits (1499), Expect = 0.0
Identities = 1549/1574 (98%), Gaps = 0/1574 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query	1958	TCGAATTCATCCCAGTAGATGAGACCTATGAAGCGGAACAAGATCTTGAAAATGCAAAGA	2017
Sbjct	1949	TCGAATTCATCCCAGTAGATGAGACCTATGAAGCGGAACAAGATCTTGAAAATGCAAAGA	2008
Query	2018	AAGCAGTGAATGCTTTGTTTACGAATACAAAAGATGGATTACGACCAGGCGTAACGGATT	2077
Sbjct	2009	AAGCAGTGAATGCTTTGTTTACGAATACAAAAGATGGATTACGACCAGGCGTAACGGATT	2068
Query	2078	ATGAAGTAAATCAAGCGGCAAACTTAGTCGAATGCCTATCAGATGATTTGTATCCAAATG	2137
Sbjct	2069	ATGAAGTAAATCAAGCGGCAAACTTAGTCGAATGCCTATCAGATGATTTGTATCCAAATG	2128
Query	2138	AAAAACGCTTGTTATTTGATGCGAGTCAGAGAGGCAAAACGACTTAGCGAGGCACGGAACC	2197
Sbjct	2129	AAAAACGCTTGTTATTTGATGCGAGTCAGAGAGGCAAAACGACTTAGCGAGGCACGGAACC	2188
Query	2198	TGCTTCAAGATCCAGATTTCCAAGAGATAAATGGAGAAAATGGATGGACTGCAAGTACAG	2257
Sbjct	2189	TGCTTCAAGATCCAGATTTCCAAGAGATAAATGGAGAAAATGGATGGACTGCAAGTACAG	2248
Query	2258	GAATTGAGGTTGTAGAAGGGGACGCTTTATTTAAAGGGCGTTATCTACGCCTACCGGGTG	2317
Sbjct	2249	GAATTGAGGTTGTAGAAGGGGACGCTTTATTTAAAGGGCGTTATCTACGCCTACCAAGGTG	2308
Query	2318	CACGACAAATTGATACGGAACGATCCAACGTATTTGTATCAAAAAATTGACGAAGGTG	2377
Sbjct	2309	CACGACAAATTGATACGGAACGATCCAACGTATTTGTATCAAAAAATTGACGAAGGTG	2368
Query	2378	TATTAAAGCCATACACAAGATATAGACTGCGAGGCTTTGTCGGAAGAAGTCAAGGGTTAG	2437
Sbjct	2369	TATTAAAGCCATACACAAGATATAGACTGCGAGGCTTTGTCGGAAGAAGTCAAGGGTTAG	2428
Query	2438	AAATTTATACGATTTCGTACCAACGAATCGGATTGTAAAAAATGTACCGGATAATTTAC	2497
Sbjct	2429	AAATTTATACGATTTCGTACCAACGAATCGGATTGTAAAAAATGTACCGGATAATTTAC	2488
Query	2498	TGCCAGATGCATCTCCGGAATGCTGGTGATGGAATCAATCGATGCAGCGAACAAAAGT	2557
Sbjct	2489	TGCCAGATGCATCTCCGGAATGCTGGTGATGGAATCAATCGATGCAGCGAACAAAAGT	2548

Figura 37. Resultado da análise de similaridade da sequência completa do gene *cry8* (BT_I622) por meio da ferramenta Blastn. Em amarelo estão destacadas as substituições de nucleotídeos.

Query	2558	ATGTAAATAGTCGTTTAGAAGGAGAAAAAGGCTTACCAAATGGCAGTCGTTCTGCTGAAG	2617
Sbjct	2549	ATGTAAATAGTCGTTTAGAAGGAGAAAAAGGCTTACCAAATGGCAGTCGTTCTGCTGAAG	2608
Query	2618	CGCATGAATTCTCTCTTCCTATTGATATAGGAGAAATCGATTACAATGAAAATGCAGGAG	2677
Sbjct	2609	CGCATGAATTCTCAATCCCTATCGATACAGGTGAAATCGATTACAATGAAAATGCAGGAA	2668
Query	2678	TATGGGTTGGCTTTAAGATTACGGATCCAGAGGGATATGCAACACTTGGAAATCTTGAAT	2737
Sbjct	2669	TATGGGTTGGATTTTAAGATTACGGATCCAGAGGGATATGCAACACTTGGAAATCTTGAAT	2728
Query	2738	TGGTAGAAGAGGGTCCATTATTAGGAGACACATTAGAACGCGTGAAAAGGAAGAACAAC	2797
Sbjct	2729	TGGTCGAAGAGGGACCTTTCTCAGGAGACGATTAGAACGCTTGCAAAGGAAGAACAAC	2788
Query	2798	AATGGAAGATTCAAATGACAAAAAGACGAGAAGAAACAGATAGAAAATATATGATAGCCA	2857
Sbjct	2789	AATGGAAGATTCAAATGACAAAAAGACGAGAAGAAACAGATAGAAAATATATGATAGCCA	2848
Query	2858	AACAGGCGGTAGACCGTTTATATGCTGATTATCAAGATCAGCAATTAATCCAAATGTAG	2917
Sbjct	2849	AACAGGCGGTAGACCGTTTATATGCTGATTATCAAGATCAGCAATTAATCCAAATGTAG	2908
Query	2918	AGATTACAGATATTACTGCGGCTCAAACCGTGATACAGTCCATTCTTATGTATATAATG	2977
Sbjct	2909	AGATTACAGATATTACTGCGGCTCAAACCGTGATACAGTCCATTCTTATGTATATAATG	2968
Query	2978	ATGCGTTCACAGGTTACCAGGAATGAACATACGAAGTTTACAGAGCTAACAGATCGAC	3037
Sbjct	2969	ATGCGTTCACAGGTTACCAGGAATGAACATACGAAGTTTACAGAGCTAACAGATCGAC	3028
Query	3038	TCCAACAAGCATGGAGTTTGTATGATCAACGAAATGCCATACCAAATGGAGATTTCCGAA	3097
Sbjct	3029	TCCAACAAGCATGGAGTTTGTATGATCAACGAAATGCCATACCAAATGGAGATTTCCGAA	3088
Query	3098	ATGAATTAAGTAATTGGAACACAACAGCTGGTGTCAATGTACAACAACCTCAATGGTACAT	3157
Sbjct	3089	ATGAATTAAGTAATTGGAACACAACAGCTGGTGTCAATGTACAACAACCTCAATGGTACAT	3148
Query	3158	CTGTCCTTGTGATTCCAAATTGGGATGCACAAGTTTCTCAACAGTTTACAGTCCAACCGA	3217
Sbjct	3149	CTGTCCTTGTGATTCCAAATTGGGATGCACAAGTTTCTCAACAGTTTACAGTCCAACCGA	3208
Query	3218	ACCAAAGATATGTGCTACGAGTTACCGCAAGAAAAGAAGGTGTAGGAAATGGATATGTAA	3277
Sbjct	3209	ACCAAAGATATGTGCTACGAGTTACCGCAAGAAAAGAAGGTGTAGGAAATGGATATGTAA	3268
Query	3278	GTATCCGTGATGGTGGAAATCAAACAGAAACGCTTACGTTTAGTGCAAGTGATTATGATA	3337
Sbjct	3269	GTATCCGTGATGGTGGCAATCAAACAGAAACGCTTACGTTTAGTGCAAGTGATTATGATA	3328
Query	3338	CAAATGGTGTGTATAATATACAAGCGTCGAATACAAACGGATATAACACAAATGGTGTGT	3397
Sbjct	3329	CAAATGGTGTGTATAATATACAAGCGTCGAATACAAACGGATATAACACAAATGGTGTGT	3388
Query	3398	ACAATGATCAAACCGGCTATATCACAAAAACAGCGGAATTCATTCCACATACAAATCAAG	3457
Sbjct	3389	ACAATGATCAAACCGGCTATATCACAAAAACAGCGGAATTCATTCCACATACAAATCAAG	3448
Query	3458	TGTGGATTGAGATGAGTGAGACCGAAGGTACGTTCTATATCGAAAGTGTAGAATTGATTG	3517
Sbjct	3449	TGTGGATTGAGATGAGTGAGACCGAAGGTACGTTCTATATCGAAAGTGTAGAATTGATTG	3508
Query	3518	TGACGTAGAGTAA	3531
Sbjct	3509	TGACGTAGAGTAA	3522

Figura 37. Resultado da análise de similaridade da sequência completa do gene *cry8* (cont.).

A sequência deduzida da proteína Cry8 comparada com as sequências de aminoácidos do GenBank, através da ferramenta BLAST (ALTSCHUL et al., 1997), revelou o isolado BT_I622 ser portador de uma proteína Cry8 distinta das subclasses descritas até o presente momento. O alinhamento realizado com sequências de aminoácidos (BLASTp) depositadas no banco de dados do NCBI, apresentou similaridade de 75% da nova proteína Cry8 com a proteína Cry8Ba1 da linhagem *B. thuringiensis kumamotoensis* PS50C (b) (U04365) (Figura 38).

A comparação com Cry8Ba1 demonstrou a presença de 172 aminoácidos diferentes na sequência da proteína Cry8 do isolado BT_I622, além da existência de 102 substituições de resíduos de aminoácidos. A região da nova proteína Cry8 que mais apresentou modificações de aminoácidos está compreendida entre os resíduos 341 a 653 e, encontra-se localizada entre os domínios II e III da proteína (Figura 41). Concomitantemente, foi constatada a ausência de seis aminoácidos na sequência proteica de BT_I622 e, treze na proteína Cry8Ba1 (Figura 38).

		sp Q45705.1 CR8BA_BACUK RecName: Full=Pesticidal crystal protein cry8Ba; AltName: Full=134 kDa crystal protein; AltName: Full=Crystalline entomocidal protoxin; AltName: Full=Insecticidal delta-endotoxin CryVIII(a) gb AAA21118.1 CryIII delta-endotoxin [<i>Bacillus thuringiensis</i>] Length=1169	
		Score = 1773 bits (4593), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 888/1182 (75%), Positives = 991/1182 (84%), Gaps = 19/1182 (2%)	
Query	1	MSPNNLNEYEIIDATPSTSVSND+TRYPFANEPTNALQNM+YKDYLRMSEGYDSEYAGSP	60
Sbjct	1	MSPNN NEYEIIDATPSTSVSND+ RYPFANEPTNALQNM+YKDYLRMS G SEY GSP	60
Query	61	EAFSGQDAVKAAGVVGQILGKLGVPFVGPIVSLYSALIDVLPWGGKMSQWEIFMEQVE	119
Sbjct	61	E F S QDAVKAAGVVG++L LGVPFVGPIVSLY+ LID+LWP KMSQWEIFMEQVE	120
Query	120	ALINKKIAEYARNKATAELEGLGNNTIYLTALEEWQKNPSSTRVLRDVNRFEILDLSLF	179
Sbjct	121	LIN+KIAEYARNKA++ELEGLGNNTIYLTALEEW++NP+ +R LRDVNRFEILDLSLF	180
Query	180	TQYMPSFRVAGYEVPLLTVYAQAANLHLLLLDASNFGEEWGLTGSEVNTYYDRQMSLTA	239
Sbjct	181	TQYMPSFRV +EVP LTVY AANLHLLLLDAS FGEEWGL+ S +N YY+RQM LTA	240

Figura 38. Alinhamento da sequência deduzida de aminoácidos da proteína Cry8 oriunda do isolado BT_I622 com a proteína Cry8Ba1 (BLASTp). Em destaque: regiões de aminoácidos distintas (em cinza), substituições de aa (em amarelo) e ausência de resíduos de aminoácidos nas sequências da nova proteína (em vermelho) e de Cry8Ba1 (em verde).

Query	240	EYSDHSVKWYNTGLDQLKGSNARQWVAYNFRREMTLTVLDDVVALFSYDTRTYPITETTA	299
Sbjct	241	EYSDHVKWY TGL +LKGS+A+QW+ YN+FRREMTLTVLDDVVALFS+YDTRTYP+ TTA	300
Query	300	QLTREVMPLGAVDVSNIGSWYDKAPSFSIAESAIRPPHLDFTITGLIVYTLRLNLS	359
Sbjct	301	QLTREVTPLGAVDVPNIGSWYDKAPSFSIEAAIRPPHFDYITGLIVYTKRSFTS	360
Query	360	DRYIRFWAGHTIGYKKVNTPETNVQMYGTNQNQLQDTSTFDFKGYNIYKTLISKDAVLFDIS	419
Sbjct	361	DRYIRFWAGHQISYKHIGTSSTFTQMYGTNQNQLQSTSNFDFTNIDYKTLNNGAVLLDIV	420
Query	420	QSGYTYTFFGMPVEFFLVNQVNNTSKLVYKPVSKDIIQITRDSELEPPATSDPIISN	478
Sbjct	421	YPGYTYTFFGMPETEFLVNQLNNTK L YK P SKDII +TRDSELEPP TS	480
Query	479	AYSHRLNHITFIYSSSTTYVPVFSWAHWSADLENTYPEKITQIPAVKANYTGPSTTVI	538
Sbjct	481	+YSHRL HITFIYSSST+TYVPVFSW H SADL NT+ +ITQIP K++ G +T +I	540
Query	539	NSRGLYGGNIVHTSNANATEAILGINCRFNFTSNQKYIVRIRYAADRSGLTKLSAGTSSR	598
Sbjct	541	RG GG++V T+ I + F +Q++ +RIRYA++ + L -S	595
Query	599	TIDFNATMTPGTSLLEYNFSKYAMSNTFFEVSTNQILNLLIFVTENFPGNLYITDKFE	654
Sbjct	596	T+ FN T + L YN FKY V +++ I L I + N NL+I D+ E	653
Query	655	FIPVDETYEAEQDLENAKKAVNALFTNTKDGLRPGVTDYEVNQAANLVECLSDDLYPNEK	714
Sbjct	654	FIPVDETYEAE DLE AKKAVNALFTNTKDGL+PGVTDYEVNQAANLVECLSDDLYPNEK	713
Query	715	RLLFDAVREAKRLSEARNLLQDPDFQEINGENGWTASTGIEVEGDALFKGRYLRLPGAR	774
Sbjct	714	RLLFDAVREAKRLSEARNLLQDPDFQEINGENGWTASTGIEVEGDALFKGRYLRLPGAR	773
Query	775	QIDTETYPTYLYQKIDEGVLKPYTRYRLRGFVGRSQGLEIYTIRHQTNRIVKNVPDNL	834
Sbjct	774	+IDTETYPTYLYQK++EGVLKPYTRYRLRGFVG SQGLEIYTIRHQTNRIVKNVPD+LLP	833
Query	835	DASPGNAGDGINRCSEQKYVNSRLEGEKGLPNGSRSAEAHEFSLPIDIGETIDYENAGVW	894
Sbjct	834	D P N - INRCSEQKYVNSRLE E +RS EAHEFS+PID GE+DYENAG+W	887
Query	895	VGFKITDPEGYATLGNLLEVEEGPLLDGTLERVKREEQWQKIQMTKRREETDRKYMIKQ	954
Sbjct	888	VGFKITDPEGYATLGNLLEVEEGPL GD LER+++EEQWQKIQMT+RREETDR+YM +KQ	947
Query	955	AVDRLYADYQDQQLNPNVEITDITAAQNVISIPYVYNDAFPGLPGMNYTKFELTDRLQ	1014
Sbjct	948	AVDRLYADYQDQQLNPNVEITDITAAQ++IQSIPYVYN+ FP +PGMNYTKFELTDRLQ	1007
Query	1015	QAWSLYDQRNAIPNGDFRNELSNWNTTAGVNVQQNLGTSVLVIPNWDAQVSQFQTVQPNQ	1074
Sbjct	1008	QAW LYDQRNAIPNGD+RNELSNWNTT+GVNVQQ+N TSVLVIPNW+ QVSQ+FTVQPNQ	1067
Query	1075	RYVLRVTARKEGVNGYVSIRDGGNQETLTFSASDYDTNGVYNIQASNTNGYNTNGVYN	1134
Sbjct	1068	RYVLRVTARKEGVNGYVSIRDGGNQ+ETLTFSASDYDTNG+Y+ QASNTNGYNTN VY	1127
Query	1135	DOTGYITKTAEFIPHTNQWIEISETEGTFYIESVELIVDVE	1176
Sbjct	1128	+ - - - - KT + - - - - NQ+WIE+SETEGTFYIESVELIVDVE	1169

Figura 38. Alinhamento da sequência deduzida de aminoácidos (cont.).

A tradução da nova proteína Cry8 pertencente ao isolado brasileiro BT_I622 foi realizada pelo programa ORF Finder (Open Reading Frame Finder), a qual disponibilizou a localização da região de leitura aberta, traduzindo a sequência de DNA do novo gene *cry8* (3531 pb) em diferentes “frames” (Figura 39).

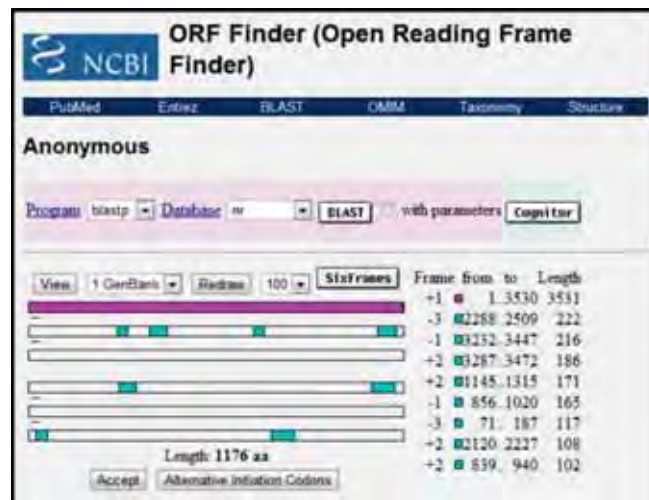


Figura 39. Fase aberta de leitura (ORF) do novo gene *cry8* de BT_I622.

A sequência deduzida da nova proteína Cry8 obtida através do banco de dados SWISS-PROT é composta por 1176 resíduos de aminoácidos, dentre os quais estão representados na sequência os códons de início (ATG) e término da tradução proteica (TAA) (Figura 40).

```

1  atgagtcctcaataatctaaatgaatatgaaattatagatgcgaca
M  S  P  N  N  L  N  E  Y  E  I  I  D  A  T
46  cttctacatctgtatctaatactaccagatacccttttgca
P  S  T  S  V  S  N  D  T  T  R  Y  P  F  A
91  aatgaaccaacaatgcgttacaaaatatgaattataaggattat
N  E  P  T  N  A  L  Q  N  M  N  Y  K  D  Y
136 ttaagaatgtctgaagggttacgatagtgaaatgtctggttcacct
L  R  M  S  E  G  Y  D  S  E  Y  A  G  S  P

```

Figura 40. Sequência deduzida da proteína Cry8 de BT_I622 pelo programa ORF FINDER (NCBI). Em destaque: códon de início da tradução gênica (ATG) (em verde), metioninas presentes na sequência proteica (em azul) e códon de finalização do gene (TAA) (em vermelho).

```

181 gaagcatttactagtgggcaagatgCGgttaaagccgcgattggt
   E A F T S G Q D A V K A A I G
226 gtggtagggtcaaattattgggaaattaggggtccatttggtggg
   V V G Q I L G K L G V P F V G
271 ccgattgtgagcctatatagtgcacttattgatgtttgtggcca
   P I V S L Y S A L I D V L W P
316 ggtggaaagagtcaatgggaaatttttatggaacaagtagaagca
   G G K S Q W E I F M E Q V E A
361 ctcattaataaaaaaatagcagaatacgcaaggaataaggcaatt
   L I N K K I A E Y A R N K A I
406 gcagaattagaggggttagggaataactacaaaatatatttaaca
   A E L E G L G N N Y K I Y L T
451 gcacttgaagaatggcagaaaaatccaagtagtacaagagtccta
   A L E E W Q K N P S S T R V L
496 cgcgatgttcagaatcgatttgaaattcttgatagtttatttacg
   R D V Q N R F E I L D S L F T
541 caatatatgCcttcttttcgggtagctggttatgaagtaccatta
   Q Y M P S F R V A G Y E V P L
586 cttacagtatatgCGcaagcagctaaccttcatttactgttatta
   L T V Y A Q A A N L H L L L L
631 aaggatgcttcaaattttggagaagaatggggattaacaggaagt
   K D A S N F G E E W G L T G S
676 gaagttaatacctattatgatcgtaaCaggtttaaactgcagag
   E V N T Y Y D R Q M S L T A E
721 tattctgatcacagtgtgaaatggtataacactggtttagatcaa
   Y S D H S V K W Y N T G L D Q
766 ttaaaaggatcgaatgctagacaatgggttgcataaaccggttc
   L K G S N A R Q W V A Y N R F
811 cgtagagagatgacactgacggtgttagatgttggtggtcattattt
   R R E M T L T V L D V V A L F
856 tcaagctatgatacgCGtacgtatccgatcgaaacgcagactcaa
   S S Y D T R T Y P I E T T A Q
901 cttacaagagaagtatatatggtgatccactcgggtgcagtagatgtg
   L T R E V Y M D P L G A V D V
946 tctaattattggatcctggtatgacaaaagcgcttctttttcggct
   S N I G S W Y D K A P S F S A
991 atagaaagtgcggctattcgaccacctcatttggttgattttata
   I E S A A I R P P H L F D F I
1036 acggggcttatagttttatacacaattacgtaatctcacttctgat
   T G L I V Y T Q L R N L T S D
1081 cgttatatacgttttttgggctggtcatacaataggatataaaaaa
   R Y I R F W A G H T I G Y K K
1126 gtcaatacacctgaaactaatgtacagatgtggaactaatcaa
   V N T P E T N V Q M Y G T N Q
1171 aatttacaagatactagcacttttgattttaagggttacaattatt
   N L Q D T S T F D F K G Y N I
1216 tacaagactctatcaaaggatgcagtactctttgatatatctcaa
   Y K T L S K D A V L F D I S Q
1261 tctggttatacgatatacattttttggaatgccggaagtcgaattt
   S G Y T Y T F F G M P E V E F

```

Figura 40. Sequência deduzida da proteína Cry8 de BT_I622 (cont.).

```

1306 tttctggtaaaccaagtgaataatactagtaagttagtgtataag
    F L V N Q V N N T S K L V Y K
1351 ccggtttccaaagatattatacagaaaacaagagattcagaacta
    P V S K D I I Q K T R D S E L
1396 gaattgcctccagcaacatcagatccaataatttctaacgcatac
    E L P P A T S D P I I S N A Y
1441 agccatagattaaatcatattacattttactccagttcaacc
    S H R L N H I T F I Y S S S T
1486 aatacgtatgtacctgtattttcttgggcacattggagtgagat
    N T Y V P V F S W A H W S A D
1531 cttgagaatacaatttatccagaaaaaattacacaaatcccagct
    L E N T I Y P E K I T Q I P A
1576 gtaaaagctaattataccgggtccttctacaacagtaataaattct
    V K A N Y T G P S T T V I N S
1621 agaggattatatggaggaatatagtacacacatctaattgctaatt
    R G L Y G G N I V H T S N A N
1666 gcgactgaagcaatcttaggaattaattgtagatttaattttaca
    A T E A I L G I N C R F N F T
1711 tcgaatcagaaatacattgttagaattagatatgctgctgacaga
    S N Q K Y I V R I R Y A A D R
1756 tctggtacgcttaaatatctgctgggacctctagcaggactata
    S G T L K L S A G T S S R T I
1801 gattttaatgaacgatgactcctgggtactagtcttgaatataat
    D F N A T M T P G T S L E Y N
1846 tcctttaaatatgcgatgcaaacacggttctttgaagttagtaca
    S F K Y A M S N T F F E V S T
1891 aatcaaatattaaaccttcttatttttgtagcggagaattttccg
    N Q I L N L L I F V T E N F P
1936 ggtaacttatacattgataaattcgaattcatcccagtagatgag
    G N L Y I D K F E F I P V D E
1981 acctatgaagcggaacaagatcttgaaaatgcaaagaaagcagtg
    T Y E A E Q D L E N A K K A V
2026 aatgctttgtttacgaatacaaaagatggattacgaccaggcgta
    N A L F T N T K D G L R P G V
2071 acggattatgaagtaaatcaagcggcaaacttagtcgaatgccta
    T D Y E V N Q A A N L V E C L
2116 tcagatgatttgatccaaatgaaaaacgcttggtattttgatgca
    S D D L Y P N E K R L L F D A
2161 gtcagagaggcaaacgacttagcgaggcacggaacctgcttcaa
    V R E A K R L S E A R N L L Q
2206 gatccagatttccaagagataaatggagaaaatggatggactgca
    D P D F Q E I N G E N G W T A
2251 agtacaggaattgaggtttagaaggggacgctttatttaaaggg
    S T G I E V V E G D A L F K G
2296 cgttatctacgcctaccgggtgcacgacaaattgatacggaaacg
    R Y L R L P G A R Q I D T E T
2341 tatccaacgtatttgatcaaaaaattgacgaaggtgtattaaag
    Y P T Y L Y Q K I D E G V L K
2386 ccatacacaagatatagactgcgaggctttgtcggaagaagtcaa
    P Y T R Y R L R G F V G R S Q

```

Figura 40. Sequência deduzida da proteína Cry8 de BT_I622 (cont.).

```

2431 gggttagaaatttatacgattcgtcaccaaacgaatcggattgta
    G L E I Y T I R H Q T N R I V
2476 aaaaatgtaccggataatttactgccagatgcatctcccggaaat
    K N V P D N L L P D A S P G N
2521 gctggatgatgaatcaatcgatgcagcgaacaaaagtatgtaaat
    A G D G I N R C S E Q K Y V N
2566 agtcgtttagaaggagaaaaaggcttaccaaattggcagtcgttct
    S R L E G E K G L P N G S R S
2611 gctgaagcgcatgaattctctcttctattgatataggagaaatc
    A E A H E F S L P I D I G E I
2656 gattacaatgaaaatgcaggagatggggttgctttaagattacg
    D Y N E N A G V W V G F K I T
2701 gatccagaaggatgatgaacacttggaatcttgaaattggtagaa
    D P E G Y A T L G N L E L V E
2746 gaggggtccattattaggagacacattagaacgcgtgaaaaggaa
    E G P L L G D T L E R V K R E
2791 gaacaacaatggaagattcaaatgacaaaaagacgagaagaaca
    E Q Q W K I Q M T K R R E E T
2836 gatagaaaatatatgatagccaaacaggcggttagaccgtttatat
    D R K Y M I A K Q A V D R L Y
2881 gctgattatcaagatcagcaattaaatccaaatgtagagattaca
    A D Y Q D Q Q L N P N V E I T
2926 gatattactgctggctcaaacgtgatacagtcattccattatgta
    D I T A A Q N V I Q S I P Y V
2971 tataatgatgcgttcccagggttaccaggaatgaactatacgaag
    Y N D A F P G L P G M N Y T K
3016 ttacagagctaacagatcgactccaacaagcatggagtttgtat
    F T E L T D R L Q Q A W S L Y
3061 gatcaacgaaatgccatacacaatggagatttccgaaatgaatta
    D Q R N A I P N G D F R N E L
3106 agtaattggaacacaacagctgggtgtcaatgtacaacaactcaat
    S N W N T T A G V N V Q Q L N
3151 ggtacatctgtccttgtgattccaaattgggatgcacaagtttct
    G T S V L V I P N W D A Q V S
3196 caacagtttacagtcacaaccgaaccaagatatgtgctacgagtt
    Q Q F T V Q P N Q R Y V L R V
3241 accgcaagaaaagaagggtgtaggaaatggatatgtaagtatccgt
    T A R K E G V G N G Y V S I R
3286 gatgggtggaatcaaacagaaacgcttacgtttagtgaagtgat
    D G G N Q T E T L T F S A S D
3331 tatgatacaaatgggtgtgtataatatacaagcgtcgaatacaaac
    Y D T N G V Y N I Q A S N T N
3376 ggatataacacaaatgggtgtgtacaatgatcaaacggctatatc
    G Y N T N G V Y N D Q T G Y I
3421 acaaaaacagcggaattcattccacatacaaatcaagtgtggatt
    T K T A E F I P H T N Q V W I
3466 gagatgagtgagaccgaagggtacgttctatatcgaaagtgtagaa
    E M S E T E G T F Y I E S V E
3511 ttgattgtagacgtagagtaa 3531
    L I V D V E *

```

Figura 40. Sequência deduzida da proteína Cry8 de BT_I622 (cont.).

A verificação da presença dos três domínios estruturais característicos das δ -endotoxinas foi realizada com o auxílio da ferramenta CD-Search (Conserved Domain Database), na qual foi possível localizar a posição dos domínios I, II e III na sequência deduzida de aminoácidos da nova proteína Cry8. O primeiro domínio (domínio I) foi identificado na região N-terminal da proteína, entre os resíduos de aminoácidos 70 e 292, cuja função está relacionada com a inserção da proteína na membrana intestinal dos insetos e, conseqüentemente, com a formação de poros (Figura 41).

O domínio II está situado entre os aminoácidos 297 e 510. Localizado entre os resíduos 520 e 659 da região C-terminal, o domínio III compreende a região da proteína Cry8 que dará origem a fração tóxica. A região referente a toxina ativada está representada entre os aminoácidos 513 e 658. Os domínios II e III são responsáveis pela ligação da toxina ativada aos receptores encontrados no intestino dos insetos-alvo (Figura 41).

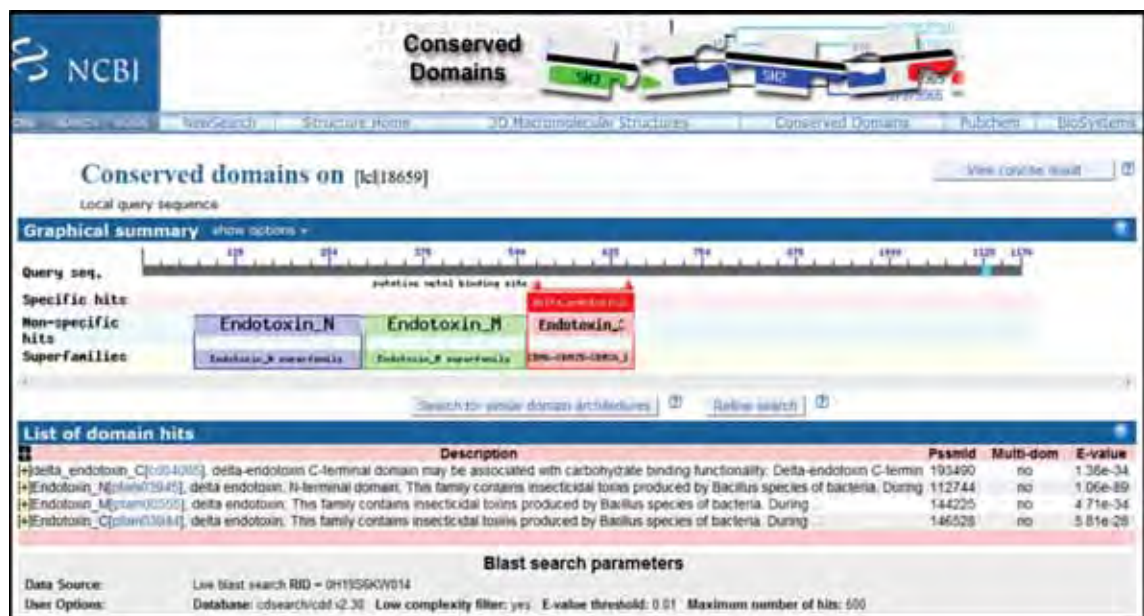


Figura 41. Domínios conservados da nova proteína Cry8 de *B. thuringiensis*.

A sequência da nova proteína Cry8 de BT_I622 foi utilizada na análise de alinhamentos múltiplos (CLUSTALW) juntamente com outras proteínas da classe Cry8, sendo posteriormente submetidas ao programa MEGA4 para a construção da árvore filogenética. O alinhamento das sequências revelou que a nova proteína Cry8 de *B. thuringiensis* possui maior proximidade evolutiva com as proteínas das subclasses Cry8Ba1 e Cry8Ea1, ou seja, são proteínas que compartilham um ancestral comum. Em contrapartida, a proteína Cry8Ia1 foi a que se mostrou mais distante filogeneticamente da proteína Cry8 (BT_I622) (Figura 42).

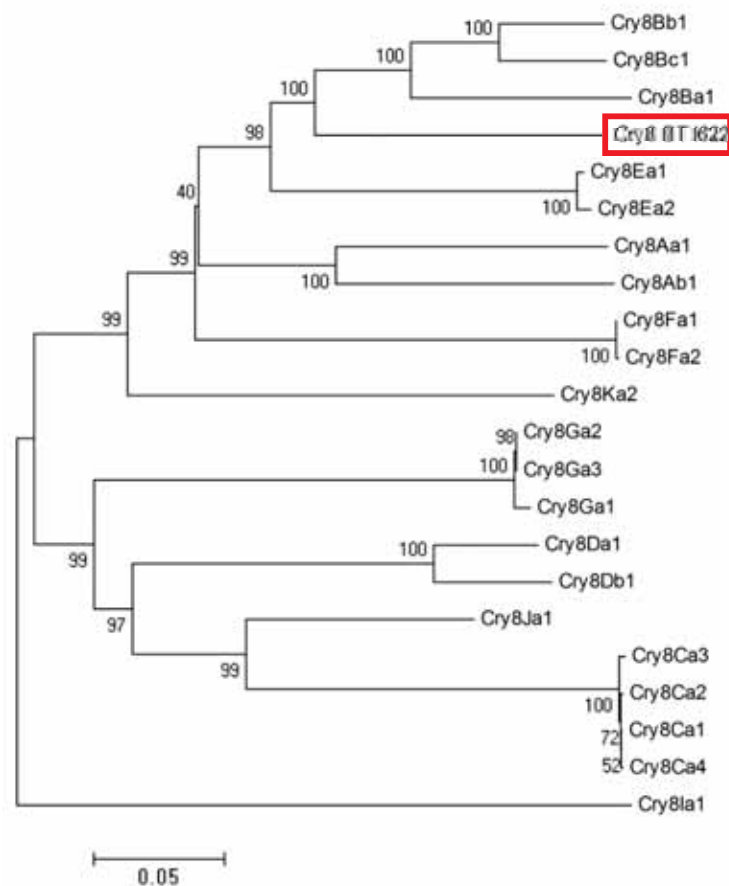


Figura 42. Análise filogenética de proteínas Cry8 (coleóptero-específicas). O filograma foi construído pelo método de “Neighbor-joining” utilizando os alinhamentos múltiplos resultantes do alinhamento realizado pelo programa CLUSTALW. A árvore foi gerada pelo programa MEGA4. As sequências utilizadas na análise foram adquiridas do banco do NCBI. O número representado nas ramificações indica os valores de “Bootstrap” (em porcentagem) obtidos em 1000 repetições.

Atualmente, mais de 550 diferentes genes *cry* tem sido identificados e classificados dentro de 68 grupos e subgrupos com base na similaridade da sequência de aminoácidos (CRICKMORE et al., 2011). Técnicas como a clonagem gênica e o sequenciamento, quando utilizadas em associação à PCR, permitem a identificação e isolamento de novos genes de *B. thuringiensis*.

SHU et al. (2009a), em estudos envolvendo a técnica de PCR-RFLP com oligonucleotídeos universais, detectaram um novo tipo de gene *cry8*, que posteriormente foi identificado como *cry8Ga1*, codificando um polipeptídeo de 1157 aminoácidos com uma massa molecular de 131,2 kDa.

Estudos realizados posteriormente com a linhagem de *B. thuringiensis* Bt185 por SHU et al. (2009b), resultaram na obtenção de outros dois novos genes, *cry8Ea1* e *cry8Fa1*, codificando polipeptídeos de 1164 e 1174 resíduos de aminoácidos, respectivamente. O alinhamento da sequência deduzida de aminoácidos das proteínas Cry8Ea1 e Cry8Fa1 indicou similaridade de 70 e 63% respectivamente com a proteína Cry8Ba.

YAMAGUCHI et al. (2008) selecionaram o isolado de *B. thuringiensis* (BBT2-5) devido a elevada toxicidade que o mesmo apresentou ao besouro *Popillia japonica* Newman (Coleoptera: Scarabaeidae). Concomitantemente, análises moleculares identificaram um novo gene denominado *cry8Dd*, com uma sequência de nucleotídeos de 3525 pb, o qual codifica para uma proteína de 1174 resíduos de aminoácidos. A partir de amostras de solo coletadas no Japão, ASANO et al. (2003) isolaram da linhagem de *B. thuringiensis* subsp. *galleriae* SDS-502 um novo gene pertencente a classe *cry8* com atividade tóxica a *Anomala cuprea* Hope (Coleoptera: Scarabaeidae), designado de *cry8Da*, o qual produz um cristal de 130 kDa.

Sendo assim, a descoberta de novos genes como o *cry8* (BT_I622) relatado nesta tese, é de extrema importância para o desenvolvimento de novos bioinseticidas promissores no controle de insetos-praga, bem como sua utilização na construção de plantas geneticamente modificadas (plantas *Bt*).

5.2. Patogenicidade da nova proteína Cry8 de BT_I622 à larvas de 2^o instar de *S. levis*

A análise da atividade bioinseticida da proteína Cry8 presente no isolado BT_I622 foi verificada através de bioensaio com larvas de 2^o instar de *S. levis*. O teste de patogenicidade foi desenvolvido com a utilização da proteína Cry8 solubilizada nas concentrações de 50 e 100 µg/ml. A quantidade de repetições utilizadas no bioensaio foi pequena devido a disponibilidade de larvas de *S. levis*.

A análise do ensaio de patogenicidade foi realizada no 15^o dia posterior à montagem do ensaio. O tratamento constituído pela linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* resultou na mortalidade de duas larvas (10%) para a proteína utilizada na concentração de 50 µg/ml e uma larva morta (5%) no tratamento de maior concentração (100 µg/ml).

Em relação ao tratamento realizado com o isolado BT_I622 (50 µg/ml), pode-se observar que dentre 20 larvas, houve a mortalidade de apenas uma (5%). Em contrapartida, o tratamento com BT_I622 (100 µg/ml) resultou na mortalidade de quatro larvas de *S. levis* (20%) (Figura 43). No controle negativo, realizado com duas testemunhas (uma contendo água previamente esterilizada e a outra composta pelo tampão fosfato utilizado na solubilização da proteína) não foi registrada nenhuma mortalidade. Os principais sintomas observados durante a realização do bioensaio foram a redução gradativa dos movimentos, inanição alimentar e a mudança na coloração corporal das larvas de *S. levis*.



Figura 43. Larvas de *S. levis* mortas devido a ingestão da nova proteína Cry8 de BT_I622.

A baixa mortalidade das larvas de *S. levis* submetidas aos tratamentos com a nova proteína Cry8 de BT_I622 pode estar associada a uma série de fatores fisiológicos do organismo do inseto: dificuldade na solubilização das proteínas devido as condições de pH, defeitos na clivagem proteolítica das toxinas, degradação das toxinas por proteases intestinais, ligação das proteínas Cry a sítios específicos de moléculas não-funcionais, modificação dos sítios de ligação e defeito na formação do poro.

A avaliação da toxicidade do isolado BT_I622 a larvas de *S. levis* também foi realizada por CÍCERO (2007), no entanto, utilizando uma suspensão composta pela mistura de esporos + cristais na concentração de 3×10^8 esporos/ml. Os resultados obtidos no bioensaio foram similares aos apresentados neste estudo, ou seja, a obtenção da baixa mortalidade de larvas de *S. levis*.

Embora a taxa de mortalidade ainda continue sendo baixa, os resultados indicam a necessidade da realização de um ensaio para a determinação da concentração letal necessária para causar a mortalidade de 50% das larvas de *S. levis* (CL₅₀). Paralelamente, testes de patogenicidade envolvendo outros insetos-praga da ordem Coleoptera são necessários para a avaliação da toxicidade e especificidade da nova proteína Cry8. Os resultados obtidos com o presente teste, preliminar à produção em larga escala da proteína por meio da expressão do novo gene *cry8* em *E. coli*, indicaram uma relativa suscetibilidade das larvas de *S. levis* a classe de proteínas Cry8.

6. CONCLUSÕES

- ✓ O isolado BT_I622 é portador de uma nova subclasse do gene *cry8*;
- ✓ O novo gene *cry8* possui 3531 pb, conforme a estratégia de “primer walking”;
- ✓ A sequência da nova proteína Cry8 é constituída por 1176 aminoácidos;
- ✓ Larvas de *Sphenophorus levis* apresentam relativa suscetibilidade a nova proteína Cry8 de *Bacillus thuringiensis*, nas condições testadas.

7. REFERÊNCIAS

AFONSI, R. R.; PEDRO JR., M. J.; BRUNINI, O.; BARBIERI, U. Condições climáticas para a cana-de-açúcar. In: PARANHOS, S. B. (Ed.). **Cana-de-açúcar: cultivo e utilização**. Campinas: Fundação Cargil, 1987. p. 42-55.

ALMEIDA, L. **Bicudo da cana *Sphenophorus levis***. Piracicaba: Centro de Tecnologia Canavieira, 2005. 3 p. (Boletim Técnico CTC).

ALMEIDA, L. C.; STINGEL, E. **Curso de monitoramento e controle de pragas da cana-de-açúcar**. Piracicaba: Centro de Tecnologia Canavieira, 2005. 32 p.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. L. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acid Research**, New York, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

ARONSON, A. E.; HAN, E. S.; McGAUGHEY, W.; JOHNSON, D. The solubility of inclusion proteins from *Bacillus thuringiensis* is dependent upon protein composition and is a factor in toxicity to insects. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 4, p. 981-986, 1991.

ARRIGONI, E. B. **Importância do bicudo da cana-de-açúcar e riscos de sua introdução em novas áreas**. Piracicaba, 2010. Disponível em: <<http://www.ctcanavieira.com.br/site/>>. Acesso em: 16 julho 2011.

ASANO, S.; YAMASHITA, C.; IIZUKA, T.; TAKEUCHI, K.; YAMANAKA, S.; CERF, D.; YAMAMOTO, T. A strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae* containing a novel *cry8* gene highly toxic to *Anomala cuprea* (Coleoptera: Scarabaeidae). **Biological Control**, Orlando, v. 28, n. 2, p. 191-196, 2003.

BAIG, D. N.; BUKHARI, D. A.; SHAKOORI, A. R. *cry* genes profiling and the toxicity of isolates of *Bacillus thuringiensis* from soil samples against American bollworm, *Helicoverpa armigera*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 109, n. 6, p. 1967-1978, 2010.

BEN-DOV, E.; ZARITSKY, A.; DAHAN, E.; BARAK, Z.; SINAI, R.; MANASHEROB, R.; KHAMRAEV, A.; TROITSKAYA, E.; DUBITSKY, A.; BEREZINA, N.; MARGALITH, Y. Extended screening by PCR for seven *cry*-group genes from field collected strains of *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 12, p. 4883-4890, 1997.

BIRCH, R. G. Plant transformation: problems and strategies for practical application. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, p.297-326, 1997.

BOONSERM, P.; DAVIS, P.; ELLAR, D. J.; LI, J. Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 348, n. 2, p. 363-382, 2005.

BOONSERM, P.; MO, M.; ANGSUTHANASOMBAT, C.; LESCAR, J. Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-angstrom resolution. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 188, n. 9, p. 3391-3401, 2006.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAVO, A.; ARABIA, S.; LOPEZ, S. L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLALOBOS, F. J.; PENA, G.; NUNEZ-VALDEZ, M. E.; SOBERON, M.; QUINTERO, R. Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 12, p. 4965-4972, 1998.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis* mechanisms and use In: GILBERT, L. I.; KOSTAS, I.; GILL, S. S. (Ed.). **Comprehensive Molecular Insect Science**. Amsterdam: Elsevier, 2005, p. 175-206.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. Mode of action *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, Elmsford, v. 49, n. 4, p. 423-435, 2007.

BRAVO, A.; JANSENS, S.; PEFEROEN, M. Immunocytochemical analysis of specific binding of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins to lepidopteran and coleopteran midgut membranes. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 60, n. 3, p. 247-253, 1992.

CESNIK, R.; MIOCQUE, J. **Melhoramento da cana-de-açúcar**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p. 23-30.

CÍCERO, E. A. S. **Caracterização molecular e seleção de isolados de *Bacillus thuringiensis* com potencial inseticida para *Sphenophorus levis***. 2007. 88 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento da safra brasileira:** Cana-de-açúcar, Safra 2011/2012, Primeiro Levantamento (maio 2011), Brasília, 2011, 19 p. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_05_27_11_53_13_boletim_cana_portugues_-_maio_2011_1o_lev..pdf>. Acesso em: 16 julho 2011.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN-RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. Acesso em: 28/06/2011. <http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/>.

DANIELS, J.; ROACH, B. T. Taxonomy and evolution. In: HEINZ, D. J. (Ed.). **Sugarcane improvement through breeding**. Amsterdam: Elsevier Press, 1987. p. 7-84.

DE BLOCK, M. The cell biology of plant transformation: current status, problems, prospects and the implications for the plant breeding. **Euphytica**, Wageningen, v. 71, n. 1-2, p. 1-14, 1993.

DEGASPARI, N.; BOTELHO, P. S. M; ALMEIDA, L. C.; CASTILLO, H. J. Biologia de *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Col.: Curculionidae), em dieta artificial e no campo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 6, p. 553-558, 1987.

de MAAGD, R. A.; BRAVO, A.; BERRY, C.; CRICKMORE, N.; SCHNEPF, H. E. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 37, p. 409-433, 2003.

de MAAGD, R. A.; BRAVO, A.; CRICKMORE, N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v. 17, n. 4, p. 193-199, 2001.

DINARDO-MIRANDA, L. L. **Nematóides e pragas de solo em cana-de-açúcar**. Piracicaba: Potafos, n. 110, p. 25-32, 2005. (Encarte do Informações Agronômicas).

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II, Error probabilities. **Genome Research**, New York, v. 8, n. 3, p. 186-194, 1998.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred I. Accuracy assessment. **Genome Research**, New York, v. 8, n. 3, p. 175-185, 1998.

FEITELSON, J. S.; PAYNE, J.; KIM, L. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. **Bio/Technology**, New York, v. 10, p. 271-275, 1992.

FERREIRA, M. G. R.; CARVALHO, C. H. S.; CARNEIRO, A. A.; CÁRDENAS, F. E. N. Introdução de genes em segmentos foliares de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* schumm.) usando biobalística. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 1, p. 279-280, 2004.

GALITSKY, N.; CODY, V.; WOJTCZAK, A.; GHOSH, D.; LUFT, J. R.; PANGBORN, W.; ENGLISH, L. Structure of the insecticidal bacterial δ -endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. **Acta Crystallographica. Section D. Biological Crystallography**, Copenhagen, v. 57, n. 8, p. 1101-1109, 2001.

GAO, M.; LI, R.; DAI, S.; WU, Y.; YI, D. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from soil in China and their pesticidal activities. **Biological Control**, Orlando, v. 44, n. 3, p. 380-388, 2008.

GLARE, T. R.; O'CALLAGHAN, M. ***Bacillus thuringiensis: biology, ecology and safety***. Chichester: John Wiley & Sons, 2000. 350p.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: A graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, New York, v. 8, n. 3, p. 195-202. 1998.

GROCHULSKI, P.; MASSON, L.; BORISOVA, S.; PUSZTAI-CAREY, M.; SCHWARTZ, J. L.; BROUSSEAU, R.; CYGLER, M. *Bacillus thuringiensis* Cry1A(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 254, n. 3, p. 447-464, 1995.

GUO, S.; YE, S.; LIU, Y.; WEI, L.; XUE, J.; WU, H.; SONG, F.; ZHANG, J.; WU, X.; HUANG, D.; RAO, Z. Crystal structure of *Bacillus thuringiensis* Cry8Ea1: an insecticidal toxin toxic to underground pests, the larvae of *Holotrichia parallela*. **Journal of Structural Biology**, San Diego, v. 168, n. 2, p. 259-266, 2009.

HABIB, M. E. M.; ANDRADE, C. F. S. Bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163p.

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 166, n. 4, p. 557-580, 1983.

HOFMANN, C.; VANDERBRUGGEN, H.; HÖFTE, H.; VAN RIE, J.; JANSENS, S.; VAN MELLAERT, H. Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 85, n. 21, p. 7844-7848, 1988.

HOFTE, H.; WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 53, n. 2, p. 242-255, 1989.

KLEIN, T. M.; GRADZILE, T.; FROMM, M. E.; SANFORD, J. C. Factors influencing gene delivery into *Zea mays* cells by high velocity of microprojectiles. **Nature Biotechnology**, New York, v. 6, p. 559-563, 1987.

KNOWLES, B. H.; DOW, J. A. T. The crystal δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*: models for their mechanism of action on the insect gut. **BioEssays**, Cambridge, v. 15, n. 7, p. 469-476, 1993.

LASSMANN, T.; SONNHAMMER, E. L. Kalign - an accurate and fast multiple sequence alignment algorithm. **BMC Bioinformatics**, London, v. 6, p. 298, 2005.

LERECLUS, D.; BOURGOIN, C. LECADET, M. M.; KLIER, A.; RAPOPORT, G. Role, structure and molecular organization of the genes coding for the parasporal delta-toxins of *Bacillus thuringiensis*. In: SMITH, I.; SLEPECKY, R. A., SETLOW, P. (Ed.). **Regulation of prokaryotic development**. Washington: American Society for Microbiology, 1989. p. 255-276.

LERECLUS, D.; DELECLUSE, A.; LECADET, M. M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J.; HIGGS, S. (Ed.). ***Bacillus thuringiensis* an environmental biopesticide: theory and practice**. Chichester: John Wiley & Sons, 1993. p. 37-70.

LI, J.; CARROLL, J.; ELLAR, D. J. Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolutions. **Nature**, London, v. 353, n. 6347, p. 815-821, 1991.

LI, J.; DERBYSHIRE, D. J.; PROMDONKOY, B.; ELLAR, D. J. Structural implications for the transformation of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin from water-soluble to membrane-inserted forms. **Biochemical Society Transactions**, London, v. 29, n. 4, p. 571-577, 2001.

MARTINS, E. S.; PRAÇA, L. B.; DUMAS, V. F.; SILVA-WERNECK, J. O.; SONE, E. H.; WAGA, I. C.; BERRY, C.; MONNERAT, R. G. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates toxic to cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). **Biological Control**, Orlando, v. 40, n. 1, p. 65-68, 2007.

MATSUOKA, S.; GARCIA, A. A. F.; ARIZONO, H. Melhoramento da cana-de-açúcar. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 2005. p. 205-251.

MONNERAT, R. G.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, v. 3, 2000, p. 163-200.

MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F. Produção de bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: Manole, 1986. p. 127-170.

MORSE, R. J.; YAMAMOTO, T.; STROUD, R. M. Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. **Structure**, London, v. 9, n. 5, p. 409-417, 2001.

MOZAMBANI, A. E.; PINTO, A. S.; SEGATO, S. V.; MATTIUZ, C. F. M. História e morfologia da cana-de-açúcar. In: SEGATO, S. V.; PINTO, A. S.; JENDIROBA, E.; NÓBREGA, J. C. M. (Ed.). **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba: Livrocere, 2006. p. 11-18.

NAZARIAN, A.; JAHANGIRI, R.; JOUZANI, G. S.; SEIFINEJAD, A.; SOHEILIVAND, S.; BAGHERI, O.; KESHAVARZI, M.; ALAMISAEID, K. Coleopteran-specific and putative novel *cry* genes in Iranian native *Bacillus thuringiensis* collection. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 102, n. 2, p. 101-109, 2009.

NOGUERA, P. A.; IBARRA, J. E. Detection of new *cry* genes of *Bacillus thuringiensis* by use of a novel PCR primer system. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n. 18, p. 6150-6155, 2010.

OGER, P.; PETIT, A.; DESSAUX, Y. Genetically engineered plants producing opines alter their biological environment. **Nature Biotechnology**, New York, v. 15, n. 4, p. 369-372, 1997.

PIGOTT, C. R.; ELLAR, D. J. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 71, n. 2, p. 255-281, 2007.

PINTO, L. M. N.; FIÚZA, L. M. Distribuição de genes *cry* de *Bacillus thuringiensis* isolados de solos do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 4, p. 699-702, 2003.

PRECETTI, A. A. C. M.; ARRIGONI, E. B. **Aspectos bioecológicos e controle do besouro *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera, Curculionidae) em cana-de-açúcar**. São Paulo: Cooperativa de Produtores de Cana, Açúcar e Alcool do Estado de São Paulo, 1990. 15p. (Boletim Técnico Copersucar).

QUECINI, V. M.; VIEIRA, M. L. C. Plantas transgênicas. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaibá: Agropecuária, 2001. p. 278-331.

REAM, W.; GELMIN, S. B. **Crow gall**: advances in understanding interkingdom gene transfer. Saint Paul: APS Press, 1996, 148 p.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. **Methods in Molecular Biology**, Totowa, v. 132, p. 365-386, 2000.

RUKMINI, V.; REDDY, C. Y.; VENKATESWERLU, G. *Bacillus thuringiensis* crystal delta-endotoxin: role of proteases in the conversion of protoxin to toxin. **Biochimie**, Paris, v. 82, n. 2, p. 109-116, 2000.

SACIOTO, R. F. Z. **Inserção do gene PR5K em cana-de-açúcar visando induzir resistência ao fungo da ferrugem *Puccinia melanocephala***. 2003. 74 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D. R.; DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 62, n. 3, p. 775-806, 1998.

SEGATO, S. V.; MATTIUZ, C. F. M.; MOZAMBANI, A. E. Aspectos fenológicos da cana-de-açúcar. In: SEGATO, S. V.; PINTO, A. S.; JENDIROBA, E.; NÓBREGA, J. C. M. (Ed.). **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba: Livrocere, 2006. p. 19-36.

SHU, C.; YAN, G.; WANG, R.; ZHANG, J.; FENG, S.; HUANG, D.; SONG, F. Characterization of a novel *cry8* gene specific to Melolonthidae: *Holotrichia oblita* and *Holotrichia parallela*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 84, n. 4, p. 701-707, 2009a.

SHU, C.; YU, H.; WANG, R.; FEN, S.; SU, X.; HUANG, D.; ZHANG, J.; SONG, F. Characterization of two novel *cry8* genes from *Bacillus thuringiensis* strain Bt185. **Current Microbiology**, New York, v. 58, n. 4, p. 389-392, 2009b.

SITNIKOVA, T.; RZHETSKY, A.; NEI, M. Interior-branch and bootstrap tests of phylogenetics trees. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 12, n. 2, p. 319-333, 1995.

STACHEL, S. E.; MESSENS, E.; VAN MONTAGU, M.; ZAMBRYSKI, P. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature**, v. 318, p. 624-629, 1985.

STEWART, G. S.; JOHNSTONE, K.; HAGELBERG, E.; ELLAR, D. J. Commitment of bacterial spores to germinate. A measure of the trigger reaction. **The Biochemical Journal**, London, v. 198, n. 1, p. 101-106, 1981.

STOTHARD, P. The Sequence Manipulation Suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. **Biotechniques**, Natick, v. 28, n. 6, p. 1102-1104, 2000.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 24, n. 8, p. 1596-1599, 2007.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

URIBE, D.; MARTINEZ, W.; CERÓN, J. Distribution and diversity of *cry* genes in native strains of *Bacillus thuringiensis* obtained from different ecosystems from Colombia. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 82, n. 2, p. 119-127, 2003.

VAN RIE, J.; JANSSENS, S.; HOFTE, H.; DEGHEELE, D.; VAN MELLAERT, H. Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins: importance of specific receptors on the brush border membrane of the mid-gut of target insects. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 186, n. 1-2, p. 239-247, 1989.

VETTORE, A. L.; SILVA, F. R.; KEMPER, E. L.; SOUZA, G. M.; SILVA, A. M.; FERRO, M. I.; HENRIQUE-SILVA, F.; GIGLIOTI, E. A.; LEMOS, M. V.; COUTINHO, L. L.; NOBREGA, M. P.; CARRER, H.; FRANÇA, S. C.; BACCI JÚNIOR, M.; GOLDMAN, M. H.; GOMES, S. L.; NUNES, L. R.; CAMARGO, L. E.; SIQUEIRA, W. J.; VAN SLUYS, M. A.; THIEMANN, O. H.; KURAMAE, E. E.; SANTELLI, R. V.; MARINO, C. L.; TARGON, M. L.; FERRO, J. A.; SILVEIRA, H. C.; MARINI, D. C.; LEMOS, E. G.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; TAMBOR, J. H.; CARRARO, D. M.; ROBERTO, P. G.; MARTINS, V. G.; GOLDMAN, G. H.; de OLIVEIRA, R. C.; TRUFFI, D.; COLOMBO, C. A.; ROSSI, M.; de ARAUJO, P. G.; SCULACCIO, S. A.; ANGELLA, A.; LIMA, M. M.; de ROSA JÚNIOR, V. E.; SIVIERO, F.; COSCRATO, V. E.; MACHADO, M. A.; GRIVET, L.; DI MAURO, S. M.; NOBREGA, F. G.; MENCK, C. F.; BRAGA, M. D.; TELLES, G.P.; CARA, F. A.; PEDROSA, G.; MEIDANIS, J.; ARRUDA, P. Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for tropical crop sugarcane. **Genome Research**, New York, v. 13, n. 12, p. 2725-2735, 2003.

VILAS-BÔAS, G. T.; LEMOS, M. V. Diversity of *cry* genes and genetic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 50, n. 8, p. 605-613, 2004.

WANG, K.; HERRERA-ESTRELLA, L.; VAN MONTAGU, M.; ZAMBRYSKI, P. Right 25-pb terminus sequence of the nopaline T-DNA is essential for and determines direction of DNA transfer from *Agrobacterium* to the plant genome. **Cell**, Cambridge, v. 38, n. 2, p. 455-462, 1984.

WILSON, K., Preparation of genomic DNA from bacteria, In: AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. (Eds.), **Current Protocols in Molecular Biology**, John Wiley & Sons Inc., New York, pp. 2.4.1-2.4.5, 1987.

YAMAGUCHI, T.; SAHARA, K.; BANDO, H.; ASANO, S. Discovery of a novel *Bacillus thuringiensis* Cry8D protein and the unique toxicity of the Cry8D-class proteins against scarab beetles. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 99, n. 3, p. 257-262, 2008.

YU, H.; ZHANG, J.; HUANG, D.; GAO, J.; SONG, F. Characterization of *Bacillus thuringiensis* strain Bt185 toxic to the Asian cockchafer: *Holotrichia parallela*. **Current Microbiology**, New York, v. 53, n. 1, p. 13-17, 2006.